

Rodrigo Ivan Prim

**Caracterização molecular de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*
resistentes à isoniazida e/ou rifampicina isoladas de amostras
clínicas do estado de Santa Catarina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Farmácia na área de concentração de Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo

Co-orientadora: Dra. Simone Gonçalves Senna

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Prim, Rodrigo Ivan

Caracterização molecular de estirpes de Mycobacterium tuberculosis resistentes à isoniazida e/ou rifampicina isoladas de amostras clínicas do Estado de Santa Catarina / Rodrigo Ivan Prim ; orientador, Maria Luiza Bazzo ; coorientador, Simone Golçalves Senna. - Florianópolis, SC, 2014.

113 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Tuberculose. 3. TB-MDR. 4. Sequenciamento. 5. Spoligotyping. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Senna, Simone Golçalves. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

**“Caracterização molecular de estirpes de
Mycobacterium tuberculosis resistentes à isoniazida
e/ou rifampicina isoladas de amostras clínicas do
Estado de Santa Catarina”**

POR


Rodrigo Ivan Prim

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

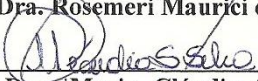
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Silvana Spindola de Miranda (UFMG – Membro
Titular)



Profa. Dra. Rosemeri Maurici da Silva (UFSC – Membro Titular)



Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC – Membro
Titular)



Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo (UFSC – Orientadora)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Maria Luiza Bazzo pela oportunidade ao aceitar-me como orientado e pelo conhecimento compartilhado durante a realização deste trabalho.

À Simone Senna, pela ajuda fornecida durante o trabalho e pela iniciação aos estudos na área da tuberculose.

Aos colegas Felipe, Lica, Letícia, Marcos, Eduardo, Mara, Taiane, Chris, Toni e aos demais integrantes do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias e do Laboratório de Hemopatias e Oncologia Experimental.

À Darcita Büerger Rovaris e a todos os funcionários do LACEN/SC, pelas valiosas contribuições prestadas.

À Dra. Jaqueline Germano de Oliveira e à Anna Carolina Figueiredo, por parte dos experimentos de sequenciamento.

À Profa. Dra. Silvana Spindola de Miranda e aos alunos Cláudio e Isabela, pelo auxílio na padronização do MIRU.

Aos funcionários do Serviço de Análises Clínicas do Hospital Universitário/UFSC

Aos meus pais, Maria Zenaide e José Humberto, pelos incentivos ao estudo, pelo amor e pela dedicação.

Aos meus irmãos, Andressa e Rafael, e à minha família, pela ajuda e carinho.

À Clarice, pelo apoio e compreensão durante a etapa final deste trabalho.

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, pelo conhecimento e formação.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Apesar dos avanços no desenvolvimento de antimicrobianos no século XX e início do século XXI, estima-se em 8,6 milhões o número de novos casos e 1,3 milhões de mortes causadas pelo bacilo da tuberculose em 2012 em todo o mundo. No estado de Santa Catarina são notificados 1700 novos casos de tuberculose por ano (27 casos/100 mil habitantes), uma das menores incidências do Brasil. Porém, algumas cidades têm altos índices, próximos a 80 casos/100 mil habitantes. O estado de SC não possui dados moleculares das estirpes resistentes circulantes e a caracterização molecular desses isolados pode auxiliar no diagnóstico e controle da tuberculose no estado. O estudo incluiu 92 isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à isoniazida e/ou rifampicina. Os isolados foram caracterizados pelo *spoligotyping* e MIRU e a detecção da resistência molecular foi avaliada pelo sequenciamento parcial dos genes associados à resistência para isoniazida (*katG*, *inhA* e *ahpC*) e à rifampicina (*rpoB*). Entre os 91 isolados resistentes à isoniazida, a mutação mais frequente foi a S315T no gene *katG* (64,8%). Apenas uma mutação foi encontrada no gene *inhA* (S94A) e 8 isolados resistentes continham mutações no gene *ahpC*. Em 23 isolados resistentes à isoniazida não foram encontradas mutações nos três genes relacionados. A mutação S531L do gene *rpoB* foi a mais prevalente entre os isolados resistentes à rifampicina (56,5%). Entre os 54 isolados resistentes à rifampicina apenas três não tinham mutações na região sequenciada. Nenhuma mutação foi encontrada nos isolados sensíveis e na estirpe H37Rv. Houve uma correlação positiva entre a mutação *katG* S315T e as estirpes da família LAM e do SIT 106. Por outro lado, foi encontrada uma correlação negativa entre essa mutação e a família T, indicando que nessa família algum outro mecanismo pode estar presente. Para a segunda mutação mais prevalente no gene *rpoB* (S531W), foi encontrada uma correlação positiva com a família LAM. O sequenciamento de outras regiões dos genes estudados e outros genes envolvidos com a resistência e a determinação da concentração inibitória mínima poderão contribuir para o entendimento dos mecanismos de resistência nos isolados onde não foram encontradas mutações. Estes achados são importantes para o desenvolvimento e aplicação de novos métodos de detecção de resistência de *M. tuberculosis*.

Palavras chave: tuberculose, TB-MDR, sequenciamento, *spoligotyping*.

ABSTRACT

Despite advances in antimicrobial development in 20th century and beginning 21st century around the world there are an estimate 8.6 million new cases and 1.3 million deaths due to tuberculosis bacilli in 2012. Santa Catarina State has notified 1700 new cases of tuberculosis per year (27 cases/100,000 population), one of the lowest Brazilian incidence rates, but some cities have high rates, about 80 cases/100.000 population. Santa Catarina state does not have molecular data about drug-resistant circulating strains, so the profile analysis will be important to tuberculosis diagnostic and control in SC. Ninety two isoniazid and/or rifampicin resistant *M. tuberculosis* strains were used in this study. The strains were analysed by *Spoligotyping* and MIRU and sequencing partial regions of genes associated to isoniazid (*katG*, *inhA* and *ahpC*) and rifampicin (*rpoB*). Among 91 isoniazid resistant strains, the most prevalent mutation was *katG* S315T (64.8%). Only one mutation was found in *inhA* gene (S94A) and 8 resistant isolates have mutations in *ahpC* gene. There was no mutation in 23 isoniazid resistant isolates. Mutation *rpoB* S531L was the most prevalent in rifampicin resistant isolates (56.5%). Only 3 rifampicin resistant isolates do not have *rpoB* mutations. No mutation was found in susceptible isolates and H37Rv strain. There was a positive correlation between *katG* S315T mutation and LAM and SIT 106 strains. There was a negative correlation between this mutation and T family, thus indicate some other resistance mechanism in this family. In gene *rpoB*, the second most prevalent mutation S531W has a positive correlation with LAM family. Sequencing others regions of studied genes and others genes evolved to resistance and minimal inhibitory concentration may contribute to understanding mechanisms of resistance in isolates that no found mutation. These findings are important to the development and application of new methods to resistance detection in *M. tuberculosis*.

Keywords: tuberculosis, MDR-TB, sequencing, spoligotyping.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
AhpC	Alkyl hidroxiperóxido redutase
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BN	Bases nitrogenadas
CTAB	Brometo de cetil-trimetilamônio
DIVE	Diretoria de Vigilância Epidemiológica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotideo trifosfato
DR	<i>Direct Repeat</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMB	Etambutol
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
INH	Isoniazida
InhA	Enoyl-ACP redutase
KatG	Catalase-peroxidase
LACEN/SC	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina
LAM	<i>Latin-American-Mediterranean</i>
LJ	Löwenstein-Jensen
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i> (Unidades Repetitivas Intercaladas de Micobactérias)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RMP	Rifampicina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SIT	<i>Spoligotyping International Type</i>
SM	Estreptomicina
SR	Sintomático Respiratório
SSPE	<i>Saline-Sodium Phosphate-EDTA</i>

TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose Multidroga Resistente
TB-XDR	Tuberculose Extensivamente Droga Resistente
TDO	Tratamento Diretamente Observado
TE	Tris EDTA
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
U	Unidades
UNAIDS	<i>Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i> (Programa articulado das Nações Unidas para HIV/AIDS)
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (Número Variável de Repetições em <i>Tandem</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Percentual de TB-MDR entre os casos novos (A) e entre os casos previamente tratados (B)	24
Figura 2:	Fluxograma das amostras utilizadas no estudo.....	39
Figura 3:	Crescimento do <i>M. tuberculosis</i> em tubo com meio sólido Ogawa-Kudoh.....	50
Figura 4:	Eletroforese em gel de agarose de PCR para os genes de resistência.....	51
Figura 5:	Ilustração das mutações encontradas nos genes relacionados com resistência à INH....	53
Figura 6:	Ilustração das mutações encontradas no <i>rpoB</i> , relacionado com resistência à RMP....	54
Figura 7:	Eletroferograma da região parcial do gene <i>katG</i> (códon 311 ao 319).....	57
Figura 8:	Eletroferograma da região parcial do gene <i>inhA</i> (códon 91 ao 100).....	58
Figura 9:	Eletroferograma da região parcial do gene <i>ahpC</i> (reverso complemento da sequência de BN -54 à -40).....	59
Figura 10:	Eletroferograma da região parcial do gene <i>rpoB</i> (códon 526 ao 535).....	61
Figura 11:	Resultado agrupado das famílias de <i>spoligo</i> typing encontradas em 92 isolados resistentes à isoniazida e/ou rifampicina do estado de SC.....	62
Figura 12:	Exemplo de determinação do alelo do MIRU 2.....	65
Figura 13:	Análise combinada utilizando o dendograma de similaridade UPGMA de 25 isolados resistentes à INH e/ou RMP.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Iniciadores utilizados na PCR do <i>spoligotyping</i>	41
Tabela 2:	Relação dos iniciadores que foram utilizados na reação de PCR do MIRU.....	44
Tabela 3:	Expressão dos resultados do MIRU de acordo com o produto amplificado.....	45
Tabela 4:	Relação dos iniciadores que serão utilizados na reação de PCR de resistência aos fármacos.....	46
Tabela 5:	Relação do perfil de resistência fenotípico das amostras.....	49
Tabela 6:	Mutações encontradas em 92 isolados clínicos resistentes provenientes do estado de Santa Catarina.....	55
Tabela 7:	Perfis de <i>spoligotyping</i> encontrados em 92 isolados resistentes à isoniazida e/ou rifampicina do estado de SC.....	63
Tabela 8:	Perfis de MIRU obtidos.....	65
Tabela 9:	Parâmetros relacionados à diversidade alélica para cada <i>loci</i> do MIRU	66
Tabela 10:	Associação entre famílias/SIT do <i>spoligotyping</i> e mutação no gene <i>katG</i> S315T.....	68
Tabela 11:	Associação entre famílias/SIT do <i>spoligotyping</i> e mutação no gene <i>katG</i> S531L.....	69
Tabela 12:	Associação entre famílias/SIT do <i>spoligotyping</i> e mutação no gene <i>katG</i> S315W.....	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1. Agente etiológico.....	21
2.2. Epidemiologia	21
2.3. Transmissão, fisiopatologia e sintomatologia.....	24
2.4. Diagnóstico da TB	26
2.4.1. <i>Infecção latente</i>	26
2.4.2. <i>Métodos para diagnóstico da TB ativa</i>	27
2.5. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)	28
2.4. Tratamento e resistência aos fármacos.....	29
2.4.1. <i>Isoniazida</i>	32
2.4.2. <i>Rifampicina</i>	33
2.4.3. <i>Outros fármacos</i>	34
2.5. Genotipagem de isolados clínicos.....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo Geral	37
3.2. Objetivos Específicos.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1. Fluxograma do estudo.....	39
4.2. Amostragem.....	39
4.3. Critérios de inclusão.....	40
4.4. Extração de DNA.....	40
4.5. Spoligotyping	41
4.5.1. <i>PCR dos espaçadores do locus DR</i>	41
4.5.2. <i>Hibridização do produto amplificado e detecção dos espaçadores</i>	42
4.5.3. <i>Análise dos spoligotypes</i>	42
4.6. MIRU.....	43
4.6.1. <i>PCR dos loci dos MIRU</i>	43
4.6.2. <i>Leitura e expressão dos resultados do MIRU</i>	44
4.7. PCR e sequenciamento dos genes associados à resistência	47
4.7.1. <i>PCR</i>	45
4.7.2. <i>Sequenciamento.....</i>	46
4.7.2.1. <i>Purificação do DNA</i>	47
4.7.2.2. <i>PCR, precipitação do DNA e sequenciamento.....</i>	47
4.7.3. <i>Análise das sequências.....</i>	48
4.8. Análise estatística	48
5. RESULTADOS.....	49

5.1. Perfil de resistência e isolamento dos bacilos.....	49
5.2. PCR para genes de resistência	50
5.2.1. <i>Análise do produto amplificado</i>	50
5.2.2. <i>Sequenciamento</i>	52
5.2.2.1. Mutações relacionadas à INH	56
5.2.2.2. Mutações relacionadas à RMP	60
5.3. <i>Spoligotyping</i>	61
5.4. MIRU e análise combinada do MIRU com o <i>spoligotyping</i>	64
5.5. Associação entre as mutações nos genes de resistência e as famílias de <i>spoligotyping</i>	68
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	79
8. PERSPECTIVAS	81
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO A. PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	111

1. INTRODUÇÃO

Conhecida há milhares de anos, a tuberculose (TB) é uma das doenças infecciosas que mais mortes têm causado em todo o mundo (DYE et al., 1999). A estimativa é de que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectado pelo bacilo causador da TB, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e, em 2012, 8,6 milhões de pessoas desenvolveram a doença e 1,3 milhões morreram, apesar da disponibilidade de fármacos antituberculose (WHO, 2013). De todos os casos estimados no mundo, 80% estão concentrados em 22 países identificados como detentores da maior incidência de TB, entre eles, o Brasil. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), neste grupo, a Índia ocupa a 1ª posição com 1.183.373 casos novos (26% dos casos mundiais) e o Brasil ocupa a 16ª posição com 71.230 casos novos (WHO, 2013).

O estado de Santa Catarina encontra-se entre aqueles com as mais baixas taxas de incidência de TB (27/100.000 habitantes), porém alguns municípios apresentam taxas iguais e/ou superiores à taxa do Brasil (46/100.000 habitantes), como por exemplo, Itajaí e Joinville, com 84,7 casos/100.000 habitantes e 46,2 casos/100.000 habitantes, respectivamente. Florianópolis apresenta uma média de 22,8 casos/100.000 habitantes (DIVE, 2010; WHO, 2013).

Ao contrário da tendência nos países industrializados, o número total de casos de TB continua aumentando nos países em desenvolvimento, principalmente nas regiões com elevada prevalência de infecções pelo vírus da imunodeficiência humana – HIV, (WHO, 2001). A coinfeção TB/HIV modificou o panorama epidemiológico da TB e, segundo a OMS, a TB e Aids juntas constituem uma calamidade sem precedentes na história (UNAIDS/WHO, 2007).

Além da coinfeção TB/HIV, outros agravos podem influenciar o curso clínico e resposta terapêutica da TB, entre eles, a desnutrição, as imunodeficiências e as infecções causadas por estirpes de MTB resistentes à múltiplos fármacos (MDR), que são definidas como resistentes, no mínimo, aos dois fármacos antituberculose mais efetivos no tratamento: rifampicina (RMP) e isoniazida (INH). Necessitando ser tratada com esquemas terapêuticos alternativos que envolvem fármacos de segunda linha mais caros, tóxicos e menos eficazes, estima-se que, mundialmente, a TB-MDR tenha causado 450 mil casos e 170 mil mortes. Além disso, os pacientes devem ser submetidos a um período ainda mais prolongado de terapia medicamentosa diária (18 meses ou

mais). Recentemente surgiu uma forma de TB, chamada de extensivamente resistente (TB-XDR) que é definida como a resistência à INH, RMP, quinolonas e outros fármacos injetáveis de segunda linha como amicacina, canamicina e capreomicina (WHO, 2008).

A resistência aos fármacos tornou-se matéria de grande preocupação para os programas de controle de TB. No Brasil, em virtude dos resultados do II Inquérito Nacional de Resistência aos medicamentos anti-TB, que indicou aumento de resistência primária à isoniazida de 4,4% para 6,0%, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose – PNCT/MS, revisou em 2009, e passou a recomendar para a fase intensiva do esquema básico, 4 medicamentos [RMP, INH, pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB)] administrados em dose fixa combinada. E, em consonância com as recomendações da Organização Mundial de Saúde – OMS, uma série de fármacos são administradas em outros esquemas de tratamento (esquema para meningoencefalite, esquema para multirresistência e esquemas especiais) (BRASIL, 2009b).

A resistência pode ocorrer por diferentes situações, entretanto o mecanismo mais comum é a mutação pontual que ocorre no gene que codifica para o alvo do fármaco, geralmente uma enzima, cuja inibição representa um efeito tóxico sobre o fármaco, diminuindo sua habilidade em se ligar à enzima (ZHANG, TELENTI, 2000; TAKIFF, 2000; RISKÀ et al., 2000).

A dificuldade de detectar a resistência resulta no atraso da terapia com o esquema adequado, contribuindo para a deflagração dos índices de TB-MDR. (SHARMA, MOHAN, 2004; DALCOLMO et al., 2007).

Portanto, é importante identificar as regiões com mutações nos diferentes genes envolvidos para o desenvolvimento de testes rápidos e sensíveis e específicos para a detecção da resistência aos múltiplos fármacos. O sequenciamento é considerado a metodologia padrão-ouro entre as análises moleculares, permitindo o estudo das mutações já conhecidas e a identificação de novas mutações envolvidas com estirpes resistentes, pois todos os nucleotídeos de uma determinada região de DNA específica do genoma das cepas clínicas são analisados e comparados com uma cepa de referência e selvagem de *M. tuberculosis* (SOINI, MUSSER, 2001).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Agente etiológico

Os agentes etiológicos causadores da TB pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), que é formado por sete espécies patogênicas (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* e *M. piniipedi*) e uma estirpe não virulenta (*M. bovis* BCG). Porém, seu principal representante é *M. tuberculosis*.

A descoberta do bacilo foi apresentada no Encontro da Sociedade de Fisiologia de Berlim em 1882 por Robert Koch, que conseguiu demonstrar com um método de coloração até então desconhecido (que utilizava azul de metileno, hidróxido de potássio e vesuvina) que o agente causador da TB, assim como o da lepra, corava-se de forma diferente dos demais micro-organismos. Em 1905 Koch foi laureado pelo Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina por suas investigações e descobertas em relação à TB (KOCK, 1882; KAUFMANN, SCHAIBLE, 2005).

O CMTB pertence ao reino Bacteria, filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, subclasse Actinobacteridae, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium* (EUZEBY, 2013).

As micobactérias são bacilos imóveis e não esporulados e têm sua parede celular formada por um alto conteúdo de lipídios, provavelmente o mais alto entre todas as bactérias. Essa camada lipídica, que corresponde a mais da metade do peso seco da micobactéria, confere ao gênero algumas características como álcool-ácido resistência, caráter hidrofóbico extremo, resistência ao dano (inclusive aos antibióticos) e importantes propriedades imunológicas, além de provavelmente contribuir para o crescimento lento de algumas espécies por meio de restrição da passagem de nutrientes (BARRERA, 2007)

O genoma completo do H37Rv, primeira estirpe de *M. tuberculosis* a ser completamente sequenciada, tem 4.411.529 pares de base (pb) em forma de DNA circular, com um conteúdo de guanina e citosina (G+C) de 65,6% (COLE et al., 1998).

2.2. Epidemiologia

O bacilo da TB pode ter sido o micro-organismo que mais matou pessoas na história (DANIEL, 2006). Estima-se que um terço da

população esteja infectado pelo bacilo, podendo desenvolver a doença (WHO, 2012).

Com a descoberta de uma série de fármacos durante o século XX, acreditava-se que a erradicação da TB seria alcançada até o final daquele século (SILVA, AINSA, 2007). Porém, com o advento do HIV, durante os anos 80 do século XX, houve o retorno do aumento do número de casos (PALMERO, 2007). Os esforços globais para o controle da TB foram revigorados em 1991, quando uma resolução da Assembleia Mundial da Saúde (WHA, World Health Assembly), que é o órgão de decisão da Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*), reconheceu a TB como o maior problema mundial de saúde pública. Esta resolução propôs duas metas principais: 1) detecção de 70% dos casos escarro-positivos novos e 2) cura de 85% desses casos até o ano de 2000 (WHO, 1991; WHO, 2006b). Porém, apenas uma das metas foi atingida; apesar de mais de 80% dos casos serem tratados com sucesso, apenas 45% dos casos foram detectados (WHO, 2006b).

Em 1994 a OMS implantou uma nova estratégia: o tratamento diretamente observado (TDO), que demonstrou uma eficiência de cura de 80%, muito superior aos 45% de eficiência de cura encontrada em áreas em que o TDO não tinha sido implantado (WHO, 1994; WHO, 2000).

No mundo, a doença atinge cerca de 12 milhões de pessoas e foram atribuídas a ela 1,3 milhão de mortes no ano de 2011. Vinte e dois países são responsáveis por aproximadamente 80% dos casos de TB no mundo, entre eles o Brasil. Em nosso país há uma estimativa de 92 mil casos de TB e uma taxa de prevalência de 46/100.000 habitantes (WHO, 2013).

Em Santa Catarina (SC), os dados apontam a incidência de 1700 novos casos, com uma taxa de 27,0/100.000 habitantes, que está abaixo da média nacional. Porém, algumas cidades apresentam altas taxas, como Itajaí com 78,6/100.000 habitantes, que é o município com a maior taxa de incidência do estado. (DIVE, 2010).

Ao contrário da tendência nos países industrializados, o número total de casos de TB continua aumentando nos países em desenvolvimento, principalmente nas regiões acometidas pelo HIV (WHO, 2001). Alguns países africanos têm percentuais de pelo menos 70% de coinfeção TB/HIV (SLOTAR et al., 2002). Na América Latina a epidemia pelo HIV permanece estável e, em 2007, o número estimado de novas infecções na região foi de 100 mil e o de mortes chegou a 58 mil. A infecção pelo HIV altera a epidemiologia da TB com a

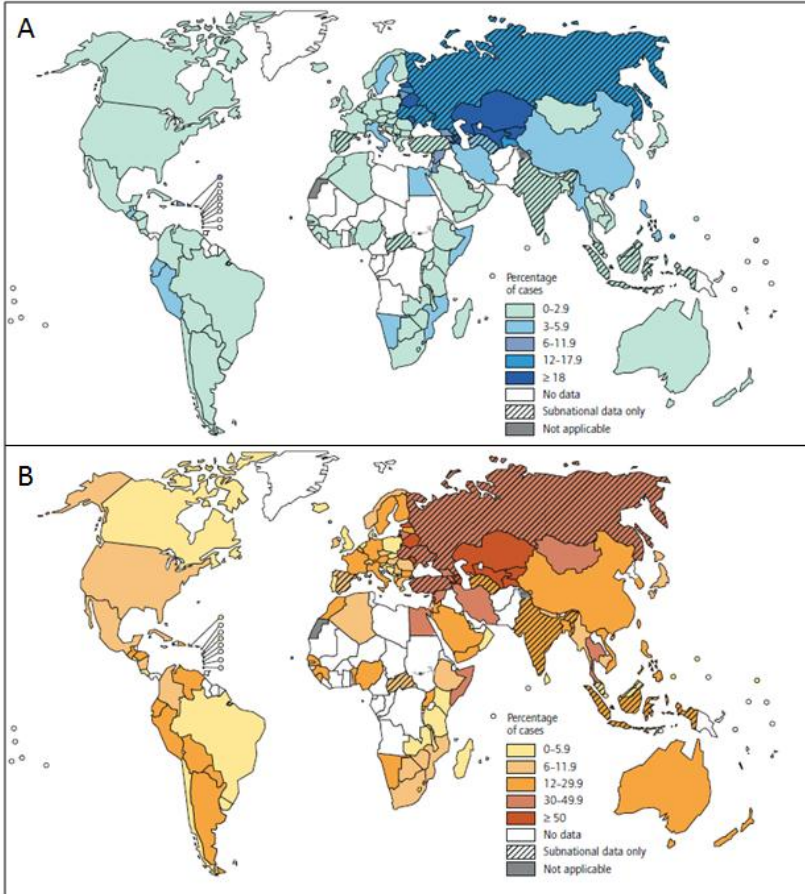
progressão da infecção latente para doença e favorecimento da primoinfecção, se tornando um dos principais fatores de risco para a TB (UNAIDS/WHO, 2007).

Além da coinfeção TB/HIV, outros agravos podem influenciar o curso clínico e a resposta terapêutica da TB, entre eles, a desnutrição, as imunodeficiências e a infecção causada por cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos múltiplos fármacos (TB-MDR). No mundo são estimados 310 mil casos de infecção por TB-MDR, sendo que no ano de 2006 foi notificada a emergência de resistência à TB, que se refere aos isolados de *M. tuberculosis* resistentes a pelo menos aos dois fármacos mais efetivos no tratamento: RMP e INH. De 2005 a 2011 o número de casos confirmados de TB-MDR saltou de 11988 para 61690. O percentual global de multirresistência para novos casos é de 3,7% e para casos previamente tratados é de 20% (Figura 1) (WHO, 2007a; WHO, 2012).

De 2002 a 2009 o estado de SC notificou 77 casos de TB-MDR, sendo que nos dois últimos anos houve o maior registro, 15 casos em cada ano, representando 2,75% de todos os casos de TB-MDR do Brasil (DIVE, 2011).

A OMS, por meio do *The Global Plan to Stop TB 2011-2015*, tem como alvo a realização do teste de sensibilidade para todos os novos casos considerados de alto risco e para todos os casos de retratamento até 2015 (WHO, 2011).

Figura 1: Percentual de MDR-TB entre os casos novos (A) e entre os casos previamente tratados (B)



Fonte: WHO, 2012

2.3. Transmissão, fisiopatologia e sintomatologia

A transmissão da TB ocorre através de aerossóis gerados principalmente pela tosse, fala e espirro do paciente bacilífero. Nas infecções pulmonares, *M. tuberculosis* entra tipicamente através da inalação pela boca ou nariz, atravessa as vias aéreas e atinge o espaço alveolar no pulmão (GUPTA et al., 2012). A infectividade do paciente é correlacionada positivamente com a concentração de bacilos no escarro (NARASIMHAN et al., 2013). Morrison e cols, (2008), em uma meta-

análise de 41 estudos realizados em países de baixa e média renda utilizando o contato como estratégia de busca para estudo da transmissão de TB, encontraram que entre contatos intradomiciliares houve um risco de pouco menos de 5% na transmissão de TB ativa e cerca de 50% de infecção latente pelo bacilo.

A TB é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica e que afeta principalmente os pulmões (PANDOLFI et al., 2007). A resposta imune tem grande importância na defesa contra o bacilo da TB, uma vez que há uma estimativa de que dois bilhões de pessoas estejam infectadas por *M. tuberculosis*, mas apenas um pequeno percentual irá desenvolver os sintomas clínicos ao longo da vida. Entretanto, o risco de desenvolver a doença aumenta consideravelmente quando a infecção por TB está associada com alguma alteração no sistema imune, como HIV (WHO, 2012; PALOMINO, 2007).

Embora a maioria dos seres humanos e animais desenvolvam a resposta imune aparentemente adequada após a infecção, essa resposta imune não é suficiente para eliminar o bacilo. Ao invés disso, leva *M. tuberculosis* a adotar o estado latente de infecção, no qual o micro-organismo está viável, mas não há nenhum sintoma clínico da TB ativa e de onde ele pode ser reativado. O bacilo é englobado por células fagocíticas e é transportado pelo epitélio alveolar até o pulmão, onde os macrófagos infectados recrutam novos macrófagos para que formem os granulomas (ERNST, 2012). Em infecções envolvendo outros patógenos, as células fagocíticas restringem e, em alguns casos, conseguem eliminar o patógeno. Porém, nas infecções micobacterianas, o recrutamento e a formação do granuloma beneficia o patógeno, proporcionando um ambiente para expansão da população de bactérias (DAVIS, RAMAKRSINAM, 2008). Na infecção latente, *M. tuberculosis* parece ter baixa atividade metabólica e, conseqüentemente, nesse estado os medicamentos têm baixa eficácia (NORTON, HOLLAND, 2012).

Cerca de 10% dos indivíduos com a infecção latente irá desenvolver a TB ativa ao longo da vida, quando ocorrem os sintomas clínicos da doença e a transmissão pode ocorrer de pessoa para pessoa. Este percentual sobe para até 10% ao ano em indivíduos infectados pelo HIV (BUCHER et al., 1999). Sabe-se que a doença passa a ser ativa quando a imunidade do hospedeiro fica comprometida, porém os mecanismos que envolvem a transição da infecção latente para a TB ativa não estão bem esclarecidos (MIRANDA et al., 2012). Um dos possíveis envolvidos na transição do estado latente para o ativo é o fator de necrose tumoral alfa - TNF- α . Em modelo murino, esta citocina parece auxiliar para a manutenção do estado latente da infecção

(MOHAN et al., 2001). Outro mecanismo que está envolvido é a depleção quantitativa e qualitativa dos linfócitos T CD4⁺, especificamente nos casos de coinfeção TB/HIV (KWAN, ERNST, 2011).

Embora a TB atinja predominantemente os pulmões, ela pode afetar qualquer órgão. Seus sintomas mais comuns são a tosse crônica, a produção de escarro, perda de apetite, perda de peso, febre e sudorese noturna (LAWN, ZUMLA, 2011). Na TB pulmonar a tosse persistente por três semanas ou mais é o sinal/sintoma mais importante, sendo utilizado para definição do paciente sintomático respiratório (SR) (WHO, 2006a). A hemoptise raramente está presente e não necessariamente indica TB ativa. A dispneia pode estar presente em doença extensa e pode ocorrer falência respiratória severa (ATS, 2000).

A busca ativa por pacientes SR deve ser realizada permanentemente por todos os serviços de saúde (níveis primário, secundário e terciário), buscando interromper a cadeia de transmissão (BRASIL, 2011).

2.4. Diagnóstico da TB

2.4.1. Infecção latente

Os métodos de diagnóstico da infecção latente têm como princípio a resposta imunológica do paciente. Neste contexto a prova tuberculínica assume um papel importante. Embora não permita diferenciar infecção latente e TB ativa, é extremamente útil para indivíduos sem sintomatologia clínica, como uma abordagem inicial à pesquisa da infecção latente.

A prova tuberculínica (PT) foi desenvolvida por Robert Koch em 1890 e é baseada na reação celular inflamatória produzida pela injeção intradérmica de PPD (Purified Protein Derivate – derivado proteico purificado), uma mistura de proteínas de baixo peso molecular, cujo resultado é verificado dentro de 24-72 horas (TEIXEIRA et al., 2007).

Duas tuberculinas são aceitas pela OMS como tuberculinas padrão: PPD-S e PPD-RT. No Brasil utiliza-se o PPD-RT 23 (Purified Protein Derivative Reset Tuberculin). É aplicado um volume de 100 µL por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, que contém 2 UT (unidades de tuberculina) e que são equivalentes à 5 UT de PPD-S (Purified Protein Derivative Standard).

Deve ser medido o maior diâmetro transversal da área do endurecido (BRASIL, 2011; COMSTOCK et al., 1981). Como o PPD é preparado a partir de *M. bovis* BCG e micobactérias não tuberculosas (MNTs), o teste tem baixa especificidade em locais de grande cobertura da vacina BCG ou com alta exposição às MNTs (JASMER et al., 2002).

Desde o final dos anos 1990, a detecção de interferon-gama no plasma vem sendo proposta alternativa diagnóstica para TB latente. O método é baseado na detecção dessa proteína produzida por linfócitos T após a apresentação dos antígenos micobacterianos (PAI et al., 2004). O método é promissor, mas ainda não atingiu padronização ideal para complementar a PT. Apesar de apresentar algumas limitações, como a descoberta de novos antígenos, esse método mostrou-se mais sensível e específico do que a PT (SCHLUGER, 2013; WHITWORTH et al., 2013).

2.4.2. Métodos para diagnóstico da TB ativa

A baciloscopia e a cultura são recomendadas como os métodos padrões para o diagnóstico da TB ativa (LAWN, ZUMLA, 2011). Estes métodos bacteriológicos, além de terem importância no diagnóstico, também são úteis para o controle do tratamento (BRASIL, 2011).

O método de coloração mais empregado para a baciloscopia é o de Ziehl-Neelsen. A parede de *M. tuberculosis* é composta por uma grande quantidade de ácidos micólicos, que é capaz de reter o complexo formado entre a carbol-fucsina e o lugol quando submetido ao processo de descoloração por solução álcool-ácida. O bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) fica corado com o complexo, enquanto as outras estruturas na lâmina coram-se pelo segundo corante utilizado, o azul de metileno (BRASIL, 2008).

A principal desvantagem da baciloscopia é seu limite de detecção, em torno de 5-10 mil BAAR/mL, o que resulta em uma moderada sensibilidade diagnóstica, especialmente em casos de TB em crianças e casos extrapulmonares. Além disso, esta técnica não distingue *M. tuberculosis* de outras micobactérias (HALDAR et al., 2011; GARG et al., 2003). Ainda assim, a baciloscopia do escarro é o método com a maior disponibilidade para ser utilizado em países com altas taxas de TB devido à simplicidade, velocidade de execução e emissão do resultado, baixo custo e exigências mínimas de equipamentos e pessoal técnico habilitado (DAVIS et al., 2013; HALDAR et al., 2011).

A cultura é reconhecida como o padrão-ouro para o diagnóstico da TB devido a sua alta sensibilidade, mesmo considerando-se o longo

tempo de crescimento, que pode ser de 6-8 semanas (WHO, 2007b; NAHID et al., 2012; GARG et al., 2003). Com a técnica realizada de maneira correta, o limite de sensibilidade é de 10-100 bacilos/mL (RIEDER et al., 2007). Para agilizar o tempo do crescimento do bacilo, foi desenvolvida cultura em meio líquido, que é mais rápida e mais sensível do que as técnicas tradicionais em meios sólidos (CHIEN et al., 2000). Sistemas automatizados de cultura líquida, como o BACTEC-960 MGIT, permitem a identificação em aproximadamente 14 dias (TORTOLI et al., 1999).

Outros métodos também estão sendo utilizados para o diagnóstico, principalmente baseados na amplificação de ácidos nucleicos, como a reação de cadeia da polimerase (PCR), que tem como objetivo detectar a presença do DNA de *M. tuberculosis*. A adoção da PCR para o diagnóstico fornece um resultado em poucas horas, mais sensível do que a baciloscopia e mais rápido do que a cultura, especialmente nos casos paucibacilares (RICHARDSON et al., 2009; LIRA et al., 2012). Os alvos moleculares mais utilizados são a sequência de inserção IS6110, o gene 16S rRNA e o gene da proteína MPB64/MTP64 (MEHTA et al., 2012).

Além de métodos laboratoriais, outra ferramenta utilizada no diagnóstico é a radiografia de tórax, que é um dos primeiros exames indicados para a investigação de sintomas respiratórios (AMB/ANS, 2011). Esse método pode auxiliar na detecção de anormalidades no pulmão, mas uma investigação da origem dessa anormalidade deve ser feita porque as lesões provocadas pela TB podem apresentar-se de várias formas na imagem radiográfica (FRIEDEN, 2004; PINTO et al., 2012). Apesar da alta sensibilidade da radiografia de pulmão para anormalidades pulmonares, sua especificidade é moderada e possui alta variação intra e interobservacional. (KOPPAKA, BOCK, 2004). Porém, em casos de suspeita de TB com ausência de BAAR no escaro, a radiografia de tórax tem um importante papel como indicador para prosseguir com a investigação clínica para o diagnóstico diferencial dos sintomas respiratórios (AMB/ANS, 2011).

2.5. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)

Tanto a partir da cultura sólida como da cultura líquida é possível realizar o antibiograma, ou teste de sensibilidade (TS). Em países que possuem recursos o TS é recomendado para todos os pacientes no momento do diagnóstico, mas países com poucos recursos não seguem essa prática e o TS é utilizado nos seguintes casos especiais: (1)

Pacientes com antecedentes de tratamento prévio independentemente do tempo decorrido; (2) Paciente com baciloscopia positiva no final do 2º mês de tratamento; (3) Falência ao tratamento anti-TB; (4) Em investigação de populações com maior risco de albergarem cepa de *M. tuberculosis* resistente (profissionais de saúde, população de rua, privados de liberdade, pacientes internados em hospitais que não adotam medidas de biossegurança e instituições de longa permanência) ou com difícil abordagem subsequente (indígenas) (BRASIL, 2010).

O método mais utilizado é o das proporções em Löwenstein-Jensen-LJ desenvolvido por Canetti e cols, publicado inicialmente em 1963 e com sua versão simplificada em 1969. O teste consiste na comparação do crescimento nos meios com antibióticos e meio sem antibiótico. Cada fármaco possui sua concentração crítica, que é utilizada no meio de cultura, e sua proporção de resistência natural (CANETTI et al., 1963; CANETTI et al., 1969). Para os 4 principais fármacos que são utilizados no teste de sensibilidade (INH, RIF, EMB e SM) a proporção crítica é 1% e as concentrações críticas são de 0,2 µg/mL, 40 µg/mL, 2 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente. Assim como a cultura em meio sólido, o teste de sensibilidade também possui a desvantagem de ser demorado, visto que a leitura dos resultados é feita após 42 dias de incubação (BRASIL, 2008).

Outro método amplamente utilizado é o teste de sensibilidade em cultura líquida BACTEC-960 – MGIT. Com essa metodologia o tempo de detecção da resistência pode diminuir para 5 a 13 dias. Após crescimento do bacilo em meio sólido ou líquido, uma suspensão padronizada é inoculada em 6 tubos diferentes, sendo que 4 destes contêm os antibióticos a serem testados (estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol – SIRE), um tubo contém ácido p-nitrobenzóico (PNB) e um tubo controle (sem adição de fármacos). O resultado do teste de sensibilidade é obtido por meio da comparação da emissão de fluorescência dos tubos contendo fármacos com o tubo controle, que indica o crescimento da estirpe em cada um dos tubos. O tubo de PNB é utilizado porque as micobactérias do complexo *M. tuberculosis* são sensíveis ao PNB, auxiliando assim na identificação do bacilo.

2.4. Tratamento e resistência aos fármacos

A história dos fármacos para o tratamento da TB iniciou-se em 1944, quando foram descobertos a estreptomicina (SM), o primeiro antibiótico efetivo contra a TB, e o ácido para-aminosalicílico (PAS) (ZETTERSTROM, 2007 SILVA, AINSA, 2007). Em 1952 um novo

fármaco foi adicionado ao arsenal terapêutico, a isoniazida (INH), e foi utilizada em conjunto com SM e PAS. Com essa associação o tratamento demorava 24 meses (MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1955). Nos anos 1960 o PAS foi substituído pelo EMB reduzindo o tratamento para 18 meses e, nos anos 1970 a RMP foi adicionada, o que diminuiu o tratamento para nove meses. Com a adição da PZA nos anos 1980, o tratamento foi reduzido para apenas 6 meses, o que é considerado tratamento de curta duração (ISEMAN, 2002). No Brasil, o EMB foi incluído no tratamento da TB apenas em 2009 como uma resposta ao aumento de casos de resistência (BRASIL, 2009b).

Pouco depois a descoberta do HIV modificou o panorama da infecção por *M. tuberculosis*. Desta forma, no final dos anos 1980 houve um ressurgimento da TB em alguns países, que levou a OMS, em 1991, a voltar sua atenção à doença, destacando-a como o principal problema de saúde pública (SCHROEDER et al., 2002; WHO, 1991).

Em 1994 foi implantado o TDO que contribuiu para a taxa de cura aumentar para 80% quando comparada aos 45% de cura em áreas sem implantação do TDO (WHO, 1994; WHO, 2000). Os componentes-chave do TDO incluem: 1) compromisso governamental; 2) detecção de casos predominantemente por busca passiva; 3) terapia de curto prazo para, no mínimo, todos os casos com escarro positivo, fornecida sob condições adequadas; 4) sistema com fornecimento regular dos fármacos; e 5) sistema de monitoramento para a supervisão e avaliação do programa. O TDO foi expandido para 182 países em 2001 e auxiliou esses países na melhoria nos programas nacionais de controle de TB (WHO, 2002). Ainda hoje o TDO continua sendo utilizado como uma estratégia para o aumento da aderência ao tratamento da TB.

Atualmente o tratamento da TB pulmonar sem histórico de tratamento anterior consiste em duas fases: 1) fase intensiva: dois meses de utilização dos medicamentos INH, RIF, EMB e PZA e 2) fase de manutenção: quatro meses de utilização dos medicamentos INH e RIF.

A resistência aos fármacos é um grande desafio no tratamento da TB, especialmente a TB multirresistente (TB-MDR). A TB-MDR é a resistência aos dois principais fármacos utilizados: INH e RIF. Seu tratamento exige esquemas terapêuticos alternativos que utilizam fármacos de segunda linha, mais caros, menos efetivos e mais tóxicos e um período de tratamento de no mínimo 18 meses (BRASIL, 2009a).

Recentemente foram identificados casos de TB extensivamente resistente (XDR-TB), quando o isolado é resistente à INH, RIF, uma fluoroquinolona e um dos fármacos injetáveis de segunda linha como amicacina, canamicina e capreomicina (RAVIGLIONE, SMITH, 2007).

A proporção global de XDR-TB entre os casos de TB-MDR é de 9,0% e, em pelo menos 84 países já foi descrito pelo menos um caso até o final de 2011 (WHO, 2012). Até 2011 foram notificados 90 casos de XDR-TB no Brasil, sendo dois casos no estado de SC (DIVE, 2011).

A resistência pode ser conferida por diferentes situações, entretanto o mecanismo mais comum é a mutação pontual que ocorre no gene que codifica para o alvo do fármaco, geralmente uma enzima, cuja inibição representa um efeito tóxico sobre o fármaco, diminuindo sua habilidade em se ligar à enzima. A resistência também pode surgir: 1) por mutações que levam ao aumento na expressão da proteína alvo, quando a quantidade de proteína torna-se maior do que a capacidade do fármaco em inibi-la; 2) pela diminuição do acúmulo do fármaco dentro da célula, dificultando sua entrada ou acelerando sua remoção da célula; 3) e pela modificação química que inativa o fármaco, contudo nenhum plasmídeo ou transposon transmissível confere resistência ao *M. tuberculosis* (ZHANG & TELENTI, 2000; TAKIFF, 2000; RISKI et al., 2000).

A dificuldade do diagnóstico da resistência resulta no atraso da adoção do esquema terapêutico correto, contribuindo para a deflagração dos índices de TB-MDR. A resistência pode ser primária ou adquirida. A resistência primária consiste nas situações nas quais indivíduos sadios se infectam com o bacilo já resistente aos fármacos. A resistência adquirida, também conhecida como secundária, resulta da utilização incorreta dos fármacos e subsequente seleção e multiplicação dos bacilos resistentes a um ou mais fármacos. Contudo, o correto uso do conceito de resistência adquirida está relacionado com a certeza de que o paciente realmente apresentou um episódio anterior de TB sensível e após exposição aos fármacos desenvolveu resistência. Por esta razão, alguns autores preconizam o uso do termo “resistência entre pacientes com ou sem história de tratamento anterior” para manter o rigor nos conceitos (SHARMA, MOHAN, 2004; DALCOLMO et al., 2007).

O Brasil participou de um estudo multicêntrico com uma amostragem de 5.138 isolados de *M. tuberculosis*, oriundos de pacientes atendidos ambulatoriamente, sendo 866 com tratamento anterior para TB e 4.272 sem tratamento prévio. Esse estudo verificou que a taxa de resistência primária foi de 8,5% (INH 4,4%, RMP 1,3%, EMB 0,1% e SM 0,2%), enquanto que, para a associação INH + RMP foi de 0,7%. A taxa de resistência adquirida foi de 21,0% (INH 11,3%, RMP 6,6%, EMB 0,1% e SM 0,8%) e para a associação INH + RMP foi de 5,9% (BRAGA et al., 2003).

2.4.1. Isoniazida

A isoniazida (INH) é o principal medicamento de primeira linha no tratamento da TB, é um pró-fármaco que atravessa a membrana por difusão passiva, mas seu mecanismo de ação ainda não está bem elucidado. Sabe-se que a INH é metabolizada pela enzima catalase-peroxidase (KatG), codificada pelo gene *katG*. O fármaco ativo liga-se covalentemente ao cofator NADH formando o aduto INH-NAD que inibe a enoyl-ACP redutase (InhA) NADH-dependente codificada pelo gene *inhA*. Essa enzima pertence ao sistema FAS-II (fatty acid synthase type II), que está envolvido na síntese de ácidos micólicos. A inibição causa o acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa e a morte celular (RICCARDI et al., 2009).

A resistência à INH é complexa, pois envolve mutações em mais de um gene. Grande parte da origem da resistência é devida ao bloqueio da ativação da pró-droga (COHEN et al., 2003).

Em 1953, Middlebrook e Cohn demonstraram que os bacilos que perdem atividade de catalase-peroxidase tornam-se resistentes à INH, mas apenas quase 40 anos depois foi demonstrado que a atividade de catalase-peroxidase envolvida com o mecanismo de ação e resistência à INH é proveniente do gene *katG* (MIDDLEBROOK, COHN, 1953; ZHANG et al., 1992). A mutação mais comum é uma alteração no códon 315 do gene *katG* que, ao invés de codificar uma serina, codifica uma treonina (Ser315Thr) (VAN SOOLINGEN et al., 2000; ZHANG, YEW, 2009). Outras regiões do gene *katG* também estão envolvidas na resistência e as únicas mutações que parecem estar presentes tanto em isolados resistentes como em sensíveis localizam-se no códon 463 (UNISSA et al., 2008).

O gene *inhA* pode contribuir com dois mecanismos. O primeiro, por meio de mutações na região codificadora da enzima do possível alvo do fármaco com consequente alteração na conformação da proteína e o segundo na região reguladora, culminando na superexpressão da enzima *InhA*, causando um desequilíbrio na inibição pelo aduto INH-NAD.

Outro gene envolvido é o *ahpC*, que codifica a enzima alquil hidroperóxido redutase (AhpC). Essa enzima, assim como a KatG, também possui atividade contra o estresse oxidativo. Alguns autores sugerem que o aumento da expressão da AhpC, resultante de mutação na região regulatória do gene *ahpC* é um mecanismo de adaptação da bactéria à perda de atividade da KatG, sendo as duas mutações relacionadas. Portanto, apesar do custo inicial no fitness promovido pelo gene *katG*, *M. tuberculosis* pode se adaptar e essa mutação in vivo por

meio de uma superexpressão da enzima AhpC, que o protege contra os efeitos oxidativos dos peróxidos orgânicos. Sendo assim, apesar da bactéria perder a função da KatG contra o estresse oxidativo, ela se adapta e leva a uma superexpressão de outra enzima com função semelhante (SHERMAN et al., 1996; COHEN et al., 2003).

Outros autores defendem que o mecanismo de mutação no gene *ahpC* pode ser independente, argumentam que o excesso de AhpC bloquearia a ativação da isoniazida de forma independente da KatG (TELENTI et al., 1997; ZHANG et al., 1996).

Nesses três genes é encontrada grande parte das mutações à INH, porém, em cerca de 20-30% dos isolados clínicos resistentes eles não estão envolvidos, o que sugere a participação de outros genes ou de outros mecanismos (RAMOS et al., 2012). Recentemente, mutações em outros genes foram descritas, como *kasA*, *tbnat* e *ndh*.

A enzima β -cetoacil-ACP sintase, codificada pelo gene *kasA* é outra enzima que pertence ao sistema FAS-II. Mutações na região codificadora do gene podem originar resistência à INH, porém, a participação da mutação nesse gene ainda é controversa. Estudos mostram que, enquanto mutações em alguns códons são responsáveis pela resistência, em outros códons não são relacionadas diretamente à resistência, mas especificamente a uma sub-linhagem da família EIA (East-African Indian) (MDLULI et al., 1998; LEE et al., 1999; SUN et al., 2007).

A enzima NAT (acetilisoniazida) é codificada pelo gene *tbnat* e, mutações no gene são relacionadas à resistência à INH. Normalmente o gene é pouco expressado, porém se a INH for acetilada pela NAT a KatG não pode exercer sua função de catalase-peroxidase sobre a INH, o que impede sua oxidação, culminando na resistência (PAYTON et al., 1999; SANDY et al., 2002).

Além disso, outra possível origem da resistência à INH é decorrente de mutações no gene *ndh*, que diminuem a oxidação de NADH, culminando no acúmulo de NADH e aumento da relação NADH/NAD⁺. O aumento dessa relação previne as reações de peroxidação necessárias para a ativação da INH, bem como uma mudança no complexo acil NADH/isonocotínico do local de ligação da enzima *InhA* (MIESEL et al., 1998; CARDOSO et al., 2007).

2.4.2. Rifampicina

A RMP é um antibiótico de amplo espectro, derivado semissintético da rifamicina que constitui a base do tratamento de curto

prazo da TB. É um fármaco bactericida que atua inibindo a subunidade β da RNA polimerase de bactérias, mas não de mamíferos. Ao se ligar na subunidade β da RNA polimerase, a RMP bloqueia a fase inicial da transcrição (CHOPRA, BRENNAN, 1998; FLOSS, YU, 2005; KOZLOV et al., 2013). A RMP é extremamente efetiva contra o bacilo da TB (MIC de 0,1 a 0,2 $\mu\text{g/mL}$) e sua atividade bactericida rápida contribui para o baixo tempo de duração do tratamento de indivíduos infectados com bacilos sensíveis. Na maioria dos casos a resistência à RMP está associada a outro fármaco, principalmente à INH, podendo então ser utilizada como um marcador para a TB-MDR (BLANCHARD, 1996; ROSSETTI et al., 2002).

Até o momento, sabe-se que a resistência à RMP é originada por mutações no gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase bacteriana, o gene *rpoB*. Em 95% a 98% das amostras resistentes no teste fenotípico verifica-se mutação na região hipervariável do *rpoB*, que é composta por 81 pb (códon 507 à 533) (COHEN et al., 2003; RISKI et al., 2000; SENNA et al., 2006). As principais mutações em isolados clínicos resistentes à RMP encontram-se nos códon 531 e 526, sendo a S531T e a H526D as mutações mais frequentes (TELENTI et al., 1993; KAPUR et al., 1994; HOFLING et al., 2005).

2.4.3. Outros fármacos

A PZA também é um importante fármaco de primeira linha que desempenha um papel essencial no tratamento da TB. Seu efeito bactericida atua principalmente na população de bacilos latentes, no ambiente ácido das lesões, uma vez que apresenta alta atividade esterilizante in vivo em ambientes ácidos (pH=5.5). O mecanismo de ação da PZA sobre *M. tuberculosis* ainda é pouco elucidado, sabe-se que é um pró-fármaco que penetra no microrganismo e requer a conversão em sua forma ativa, o ácido pirazinóico (POA), pela enzima pirazinamidase/nicotinamidase (PZAse), codificada pelo gene *pncA* (SCORPIO & ZHANG, 1996). Mutações no gene *pncA*, que resultam na falha da atividade da enzima PZAse, são responsáveis por conferir resistência a *M. tuberculosis* (RODRIGUES et al., 2005; SEKIGUCHI et al., 2007).

O EMB é um fármaco bacteriostático, ativo contra bacilos em crescimento, não exercendo nenhum efeito sobre os bacilos não-replicantes (TAKAYAMA et al., 1989). Embora várias hipóteses tenham sido propostas para explicar seu mecanismo de ação aceita-se que atua conferindo uma alteração na estrutura da parede celular

micobacteriana por meio da inibição da polimerização da arabinana em arabinogalactana e lipoarabinomanana induzindo o acúmulo de D-arabinofuranosil-P-decaprenol, um intermediário da biossíntese de arabinana. A arabinosil transferase, codificada pelo gene *embB*, é uma enzima envolvida na síntese de arabinogalactana, e tem sido proposta como alvo do EMB no *M. tuberculosis*, sendo mais comuns as mutações no códon 306 desse gene, considerada a região determinante de resistência ao fármaco (SEKIGUCHI et al., 2007).

2.5. Genotipagem de isolados clínicos

A genotipagem de isolados clínicos de MTB pode contribuir para a compreensão da epidemiologia da TB e ajuda a aprimorar informações a respeito da dinâmica de transmissão, determina a importância da diferenciação entre recidiva ou reinfecção, investigação e confirmação de surtos, confirmação de contaminação cruzada laboratorial e identificação dos clones de maior ocorrência, inclusive os clones de TB-MDR (TESSEMA et al., 2013; BARNES, CAVE, 2003).

Os métodos mais utilizados para a genotipagem de MTB são o RFLP-IS6110 (Restriction Fragment Length Polymorphism do gene IS6110), MIRU (mycobacterial interspersed repeat units) e spoligotyping (spacer oligonucleotide typing) (ROZO-ANAYA, RIBON, 2010; VIEDMA et al., 2011).

A análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição da sequência de inserção IS6110 fundamenta-se na distribuição da sequência de inserção IS6110 em diferentes estirpes, que é diferente entre os isolados não relacionados epidemiologicamente. O método utiliza a enzima de restrição PvuII e sondas que hibridizam na IS6110, diferenciando as estirpes pelo padrão do tamanho molecular dos fragmentos gerados (VAN EMBDEN et al., 1993). Embora seja considerado o padrão-ouro, o RFLP-IS6110 possui algumas desvantagens como ter que partir de uma grande quantidade de bactérias, alto custo, extremamente laborioso e baixo poder de resolução em estirpes com menos de seis sequências de inserção IS6110 no DNA genômico (THIERRY et al., 1990; BURGOS, PYM, 2002).

O DNA micobacteriano possui várias unidades de repetição intercaladas (mycobacterial interspersed repeat units - MIRU). A genotipagem baseada no MIRU caracteriza as estirpes de MTB pelo número e tamanho de 12 MIRUs independentes, utilizando uma PCR seguida de algum método de separação, como a eletroforese em gel,

para determinação desses parâmetros. O método possui um alto poder discriminatório e possibilidade de automação (SUPPLY et al., 2000).

As espécies do CMTB possuem locus de repetição direta (direct-repeat - DR), que possui 36 pb e presente no genoma em número de 10 a 50 cópias. A sequência DR é bem conservada entre as espécies, porém os espaçadores são somente conservados entre os isolados relacionados. Utilizando-se iniciadores que irão se ligar ao final de uma DR e no início da DR seguinte, é possível amplificar esses espaçadores e detectá-los por hibridização reversa em uma membrana com oligonucleotídeos imobilizados complementares aos espaçadores. O spoligotyping tem como fundamento a detecção de 43 espaçadores de 37 a 41 pb, que podem estar presentes ou ausentes no DNA genômico do MTB (GROENEN et al., 1993; KAMERBEEK et al., 1997). O padrão de presença ou ausência gera um código binário de 43 elementos que pode ser reduzido a um código octogonal com 15 números (DALE et al., 2001). O spoligotyping é um método rápido, simples e robusto (KANDUMA et al., 2003). Necessita de uma pequena quantidade de DNA, possibilita a amplificação diretamente da amostra clínica e o padrão de presença ou ausência pode ser expresso em formato digital. Para esta metodologia foi compilado um dos maiores bancos de dados mundiais de estirpes caracterizadas, contendo informações de mais de 60 mil estirpes distribuídas em 153 países (DEMARY et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar o perfil de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à INH e/ou RMP a partir de amostras clínicas do estado de Santa Catarina.

3.2. Objetivos Específicos

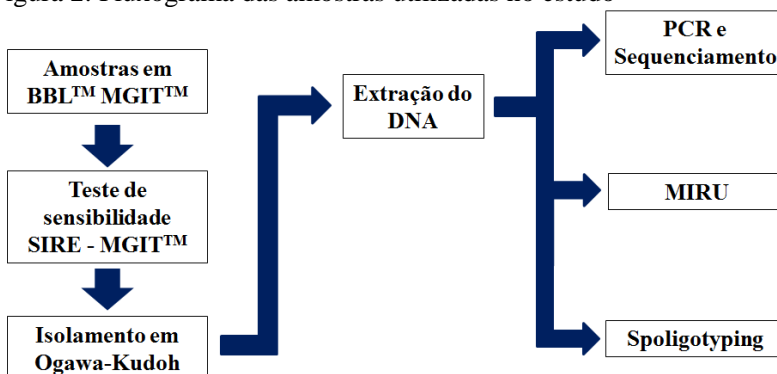
- Sequenciar regiões parciais dos genes *katG*, *inhA*, *ahpC* e *rpoB* e identificar os pontos de mutações envolvidos com a resistência à INH e à RMP;
- Comparar as mutações identificadas nos isolados do estado de Santa Catarina com o perfil de mutações mais frequentes no Brasil e no mundo;
- Determinar os perfis de *spoligotyping* e MIRU dos isolados resistentes do estado de Santa Catarina;
- Relacionar as mutações encontradas com os perfis de *spoligotyping*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fluxograma do estudo

Trata-se de um estudo descritivo com isolados de *M. tuberculosis* obtidos de amostras clínicas utilizadas para o diagnóstico de TB no Setor de Tuberculose do Laboratório Central de Santa Catarina-LACEN/SC, referência estadual para TB. Após a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, o isolado clínico foi repicado em meio Ogawa-Kudoh (Laborclin – Brasil) para isolamento da micobactéria e extração do DNA. A partir do DNA extraído foram feitos os testes moleculares (amplificação e sequenciamento parciais dos genes de resistência, *spoligotyping* e MIRU). O fluxograma completo do estudo está na Figura 2.

Figura 2: Fluxograma das amostras utilizadas no estudo



4.2. Amostragem

Foram analisados 92 isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH e/ou RMP provenientes do banco de estirpes do LACEN/SC do período de janeiro de 2008 a janeiro de 2012. Para controle do sequenciamento foram incluídos 12 isolados clínicos sensíveis aos fármacos, além da estirpe selvagem de referência *M. tuberculosis* H37Rv.

As amostras clínicas foram descontaminadas pelo método de Petroff (BRASIL, 2008) e cultivadas em sistema automatizado BACTEC®-960-MGIT™ (BD – EUA), que utiliza meio de cultura

líquido Middlebrook 7H9 com adição de antibióticos e enriquecido com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), ou meio sólido a base de ovo Löwestein-Jensen (Difco – EUA)

Quando detectado *M. tuberculosis*, foi realizado o teste de sensibilidade aos seguintes antimicrobianos: estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol (SIRE) também no sistema automatizado BACTEC®-960-MGIT™ (BD – EUA).

As estirpes foram isoladas em meio de cultura Ogawa-Kudoh, (Laborclin, Brasil), tendo sido cultivadas por 4 semanas à 37°C.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UFSC) e aprovado sob parecer nº 204.297 (Anexo A).

4.3. Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo as estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à INH e/ou RMP isoladas a partir de amostras clínicas recebidas na rotina do LACEN/SC durante o período determinado. A identificação dos isolados foi feita por meio dos testes fenotípicos presença do fator corda em meio líquido e inibição do crescimento no meio com PNB. As micobactérias não tuberculosas foram excluídas do estudo.

4.4. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada conforme metodologia descrita por van Soolingen e colaboradores (1994). Para o preparo de todos os reagentes foi utilizada água purificada (Millipore – EUA). O DNA extraído foi utilizado para as reações do *spoligotyping*, MIRU e sequenciamento dos genes de resistência.

Primeiramente, foi realizado o aquecimento de uma suspensão das colônias em TE 1X (solução tampão 10mM Tris/1mM EDTA, pH 8,0) (Promega – EUA/Bio-Rad – EUA) por 30 minutos a 90°C. Nestas condições os isolados de *M. tuberculosis* foram inativados. Foram adicionados, aos isolados, 50 µL de lisozima 10 mg/mL (Sigma-Aldrich - EUA), a mistura foi agitada em vórtex e incubada por 24 horas a 37°C para a digestão da parede celular. A suspensão resultante foi misturada com uma solução de SDS/proteinase K (70 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K 1%) (Invitrogen – EUA/Ambion - EUA), agitada no vórtex e incubada a 65°C por 10 minutos para a lise das membranas e digestão proteica. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5 mol/L (Merck - Alemanha) e 100 µL de CTAB/NaCl (brometo de cetil-trimetilamônio

10% em NaCl 5 M) (Sigma-Aldrich - EUA). A suspensão foi agitada em vórtex e novamente incubada a 65°C por 10 minutos. Para a separação do DNA, foram adicionados 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (Sigma-Aldrich – EUA/Vetec – Brasil), agitado no vórtex e centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante aquoso foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 450 µL de isopropanol (Amresco – EUA) e incubado por 24 horas à -20°C. Após a precipitação do DNA, foi realizada uma centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm e foi desprezado o sobrenadante vertendo o tubo. O *pellet* resultante foi lavado com 1 mL de etanol 70% (Sigma-Aldrich – EUA) a frio, centrifugando por 5 minutos a 12.000 rpm e desprezando novamente o sobrenadante. O tubo foi colocado em um banho-maria seco à 37°C por aproximadamente 1 hora até secar o *pellet* completamente. O DNA foi ressuscitado com 20 µL de tampão TE 1X e armazenado a -20°C até as análises moleculares.

4.5. *Spoligotyping*

4.5.1. *PCR dos espaçadores do locus DR*

A primeira etapa do *spoligotyping* consistiu em uma PCR para amplificar os espaçadores do locus DR. Os iniciadores utilizados, *forward* e *reverse* pareiam nos finais e nos inícios de cada região repetitiva DR, respectivamente. O volume final em cada reação foi de 50 µL, que foi composta de 5 µL de tampão 10X (10 mM Tris-HCl pH 8,1; 50mM KCl) (Promega – EUA), 1 µL de DNA de cada amostras e as concentrações finais de 3 mM de MgCl₂ (Invitrogen – EUA), 20 pmoles de cada um dos iniciadores (Tabela 1) (Ludwig – Brasil), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs) (Invitrogen – EUA) e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen – EUA). As condições da PCR foram 94°C/3 minutos, seguido por 20 ciclos de 96°C/1 minuto, 55°C/1 minuto e 72°C/30 segundos e, para a extensão final 72°C/5 minutos.

Tabela 1: Iniciadores utilizados na PCR do *spoligotyping*

Iniciador	Sequencia do oligonucleotídeo
DRa	5'- GGT TTT TGG GTCTGACGAC-3'-Biotina
DRb	5'- CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'

4.5.2. Hibridização do produto amplificado e detecção dos espaçadores

Para a hibridização na membrana de *spoligotyping*, 20 µL do produto amplificado foi diluído em SSPE 2X (Na₂HPO_{4.2}H₂O 0,02 M, NaCl 0,36 M, EDTA 2 mM – pH 7,4) /SDS 0,1% (Merck – Alemanha/Bio-rad – EUA/Invitrogen – EUA), aquecido a 99°C por 10 minutos para abertura da dupla-fita e resfriado em gelo imediatamente após terminar a incubação. As amostras diluídas foram aplicadas na membrana comercial com os 43 oligonucleotídeos imobilizados direcionados contra 43 possíveis espaçadores com a ajuda de um *miniblotter* (Ocimum Biosolutions - Índia). Após a aplicação, o conjunto foi colocado em um forno de hidridização (Marconi - Brasil) a 60°C por 60 minutos. A membrana foi lavada 2 vezes com SSPE 2X/SDS 0,5% a 60°C por 10 minutos e inserida em uma garrafa circular de 40 mm de diâmetro. Foram adicionados 1,25 U do conjugado estreptavidina-peroxidase (Roche – Suíça) em SSPE 2X/SDS 0,5% dentro da garrafa, que foi incubada a 35°C por 50 minutos. Em seguida, foram realizadas 2 lavagens a 35°C por 10 minutos e 2 lavagens a temperatura ambiente por 5 minutos. Para a detecção foi utilizado o kit ECL™ (Amersham Biosciences - Inglaterra), em uma reação de quimioluminescência. A membrana foi transferida da garrafa para um chassi/ecran radiográfico (Konex – Brasil), adicionada com o líquido de detecção ECL™ e coberta com um filme radiográfico (Agfa Healthcare - Brasil). Após 20 minutos de incubação foram realizadas as etapas finais de revelação, fixação, lavagem e secagem do filme (General Eletric – EUA).

4.5.3. Análise dos spoligotypes

A interpretação do *spoligotyping* foi feita por meio do padrão de presença/ausência dos 43 espaçadores. A presença do espaçador é representada pelo quadrado preto e a ausência do espaçador pelo quadrado branco. Após a determinação do perfil, a amostra foi comparada com o banco mundial de spoligotypes *The SITVIT Database* (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/trouverSouchesParSpoligo.jsp>; *Institute Pasteur de Guadeloupe*, França). Cada padrão do perfil corresponde a um SIT (*Spoligotyping International Type*) (KAMERBEEK et al., 1997; SOLA et al., 2001).

4.6. MIRU

A reação para os loci do MIRU 02, 04, 10, 16, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40 foi padronizada no laboratório durante o mestrado seguindo o protocolo de Supply e cols. (2000).

4.6.1. PCR dos loci dos MIRU

O protocolo utilizado para a amplificação das regiões próximas a cada um dos MIRU continha 5 µL de tampão 10X (10 mM Tris-HCl pH 8,1; 50mM KCl), 5 µL de DNA diluído 1/100 de cada amostra e as concentrações finais de 2,0 mM de MgCl₂, 20 pmoles dos iniciadores (Tabela 2), 0,5 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs), 1% de DMSO e 1 U de *Taq* DNA polimerase. As condições da PCR foram 95°C/15 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C/1 minuto, 55°C/1 minuto e 72°C por 2 minutos e, para a extensão final, 72°C/10 minutos.

Em algumas regiões o MIRU 20 tem uma pobre variabilidade (VARMA-BASIL, 2011). Devido a isso e a dificuldade de padronização, esse alelo não foi incluído nos resultados.

Tabela 2. Relação dos iniciadores que foram utilizados na reação de PCR de resistência aos fármacos

MIRU	Iniciadores utilizados para a PCR
02	02F - 5'- TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT-3' 02R - 5'- ATTTTGAGCCGGCGTCCGAGTA -3'
04	04F - 5'- GCGCGAGAGCCCGAACTGC -3 04R - 5'- GCTGACGTTTCTGCTGCGC -3'
10	10F - 5'- GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC -3 10R - 5'- AGGTAGCTGATCACCAAGGTGGC -3
16	16F - 5'- TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA-3 16R - 5'- GTACCAGGGCTGCACGACGGG -3
23	23F - 5'- CTGTTCGATGGCCGCAACAAAACG-3 23R - 5'- GACAAAAGGGCGAACCCGTTGAGCT -3'
24	24F - 5'-CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT-3 24R - 5'-TTCTGTGAGCTCAACTCGCCC -3
26	26F - 5'-TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC -3 26R - 5'- CTATTTCGCTGGTTCGCTATG -3
27	27F - 5'-TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA-3' 27R - 5'-TTGAGTGGCACGCTCACATCGC -3'
31	31F - 5'- ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA3 31R - 5'- ATCAAGACCACGTCGGCAC -3'
39	39F - 5'- CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC -3 39R - 5'- ATGTGTGGGGCGTAGACGTTTCCG -3
40	40F - 5'- GGGTTGCTGGATGACAACGTGT -3 40R - 5'- TATCTGATTCGCCGAGATCACCC -3

Os produtos amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 2,5% a (100 V/ 2 h) e corados pelo brometo de etídio (1µg/ml). Foi adicionado, em paralelo às amostras, marcador de tamanho molecular 100 pb *ladder* (Ludwig - Brasil). Os géis foram visualizados e fotografados sob iluminação ultravioleta de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV- 20), utilizando um sistema de fotodocumentação de géis ImageQuant LAS 500 (General Electric - EUA).

4.6.2. Leitura e expressão dos resultados do MIRU

Após a separação eletroforética, os tamanhos dos produtos foram estimados de acordo com os marcadores de tamanho molecular utilizados. Para expressão dos resultados foram utilizados os números de alelos correspondentes aos produtos amplificados obtidos, formando 11 números em sequência, que representam cada MIRU (02, 04, 10, 16, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40) (Tabela 3).

Tabela 3: Expressão dos resultados do MIRU de acordo com o produto amplificado.

Alelo	MIRU											
	02	04	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354
1	455	252	537	618	514	300	447	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678
7	773	714	855	936	976	518	771	642	869	863	911	732
8	826	791	908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110
15	1197	1330	1279	1460	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164

4.7. PCR e sequenciamento dos genes associados à resistência

4.7.1. PCR

O DNA foi amplificado pela PCR em 50 μ L de reação contendo 5 μ L de tampão 10X (10 mM Tris-HCl pH 8,1; 50mM KCl), 1 μ L de DNA de cada amostra e as concentrações finais de 1,5 mM de $MgCl_2$,

25 pmoles dos iniciadores (Tabela 4), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) e 1 U de *Taq* DNA polimerase. As condições da PCR para os genes relacionados à isoniazida (*katG*, *inhA* e *ahpC*) foram 94°C/10 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C/2 minutos, 55°C/1 minuto e 72°C/2 minutos e, para a extensão final, 72°C/7 minutos e para o gene de resistência á RMP (*rpoB*) foram 40 ciclos de 94°C/1 minuto, 55°C/1 minuto e 72°C/1 minuto. Os produtos obtidos por meio da PCR são de 233 pares de base (pb) para o gene *katG*, 207 pb para o gene *inhA*, 359 pb para o gene *ahpC* e 411 para o gene *rpoB* (SILVA et al., 2003; TELENTI et al., 1993).

Tabela 4. Relação dos iniciadores que foram utilizados na reação de PCR de resistência aos fármacos

Fármaco	Gene	Iniciadores utilizados para amplificação dos genes
Isoniazida	<i>katG</i>	<i>katG</i> 1-f 5'-AGCTCCTATGGCACC GGAAAC-3' <i>katG</i> 4-r 5'-AACGGGTCCGGGATGGTG-3'
	<i>inhA</i>	<i>inhA</i> -f 5'-CGACATACCTGCTGCGCAAT-3 <i>inhA</i> -r 5'-CGGGATACGAATGGGGGTTT-3'
	<i>ahpC</i>	<i>ahpC</i> -f 5'-GAGACCGGCTTCCGACCACC-3 <i>ahpC</i> -r 5'-GCTGGTAGCGGGGAATTGAT-3
Rifampicina	<i>rpoB</i>	TR1-f 5'-AGTTCTTCGGCACCAGC-3 TR2b-r 5'-CGCTCACGTGACAGACC-3

Os produtos amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 2% a (100 V/ 2 h) e corados pelo brometo de etídio (1µg/ml). Foi adicionado, em paralelo às amostras, marcador de tamanho molecular 50 pb *ladder* (Ludwig – Brasil). Os géis foram visualizados e fotografados sob iluminação ultravioleta de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV- 20), utilizando um sistema de fotodocumentação de géis ImageQuant LAS 500 (GE - EUA).

4.7.2. Sequenciamento

O sequenciamento dos genes de resistência foi realizado em dois locais distintos utilizando dois sequenciadores diferentes.

A primeira parte foi realizada no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems - Life Technologies) utilizando-se o kit ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing, no Laboratório de Identificação Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre/RS. Algumas

sequências não apresentaram boa qualidade e foram repetidas no sequenciador ABI 3730 utilizando-se o mesmo kit, no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ Minas.

4.7.2.1. Purificação do DNA

A purificação do DNA foi realizada com o *PureLink*[®] PCR *Purification Kit* (Invitrogen, Carlsbad/USA).

Foram adicionados 180 µL de tampão de ligação aos 45 µL do produto amplificado pela PCR e colocados no vórtex por alguns segundos. Essa solução foi passada por uma coluna de separação (*PureLink*[®] Spin Column) e centrifugada por 1 minuto a 13400 rpm. O líquido que passou pela coluna de separação foi descartado. A coluna de separação foi lavada com 650 µL de tampão de lavagem e centrifugado por 1 minuto a 13400 rpm. O líquido foi novamente descartado e a coluna de separação foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 50 µL de tampão de eluição no centro da coluna, incubado por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugado por 2 minutos a 13400 rpm.

4.7.2.2. PCR, precipitação do DNA e sequenciamento

Para a PCR do sequenciamento, foram utilizados 2 µL de tampão Tris-HCl, 1 µL de BigDye Terminator v1.1/3.1 *Sequencing Buffer*, contendo dNTP, ddNTP, Taq DNA polimerase e MgCl₂ (Applied Biosystems - EUA), 1 µL do iniciador forward ou reverse (3,2 pmol), 5 µL do produto purificado diluído (contendo 3-10 ng de DNA) e 1 µL de água purificada. A PCR foi feita em placa de 96 poços. As condições foram 96°C/2 segundos, seguidos por 35 ciclos de 96°C/10 segundos, 55°C/45 segundos e 72°C/60 segundos e extensão final de 72°C/60 segundos.

Após a retirada da placa do termociclador, foram adicionados 40 µL de isopropanol 65%, a placa foi agitada no vortex e incubada por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro. Em seguida foi centrifugada por 45 minutos a 3700 rpm. Descartou-se o sobrenadante, vertendo a placa. O precipitado foi lavado com 250 µL de etanol 60% e a placa foi centrifugada por 15 minutos a 3700 rpm e colocada no termociclador por 1 minuto a 90°C para secar. O produto amplificado foi ressuspensão com 20 µL de formamida, desnaturado por 5 minutos a 96°C, transferido

para um banho-maria de gelo imediatamente e os produtos injetados no sequenciador.

4.7.3. Análise das sequências

As sequências obtidas foram analisadas no programa Chromas Lite 2.1 (Technelysium, Austrália) e comparadas por alinhamento com a sequência da estirpe selvagem de referência de *M. tuberculosis* H37Rv, por meio da ferramenta ClustalW (alinhamento múltiplo de sequências) contida no programa BioEdit (Ibis Biosciences, EUA). A região parcial do gene *ahpC* foi amplificada e sequenciada no reverso complemento.

4.8. Análise estatística

As variáveis nominais foram expressas em forma de número absoluto e/ou percentual e as variáveis numéricas em forma de média e desvio-padrão. Para a associação entre as variáveis nominais foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Foi considerado significativo um valor de $p \leq 0,05$.

Para a construção do dendograma de similaridade da combinação dos métodos de *spoligotyping* e MIRU foi utilizado o site miru-vnrplus.org por meio do método UPGMA (*unweight pair group method with arithmetic mean*). Para a definição de *cluster*, foi considerado o valor de 100% de similaridade entre dois ou mais isolados (MARAIS, 2013) e foi definido grupo de infecção recente (GIR) como 90% ou mais de similaridade (ROSAS et al., 2013) A diversidade alélica do MIRU foi estimada pelo Índice Discriminatório de Hunter-Gaston (HGDI – *Hunter-Gaston Discriminatory Index*) (HUNTER, GASTON; 1988).

5. RESULTADOS

5.1. Perfil de resistência e isolamento dos bacilos

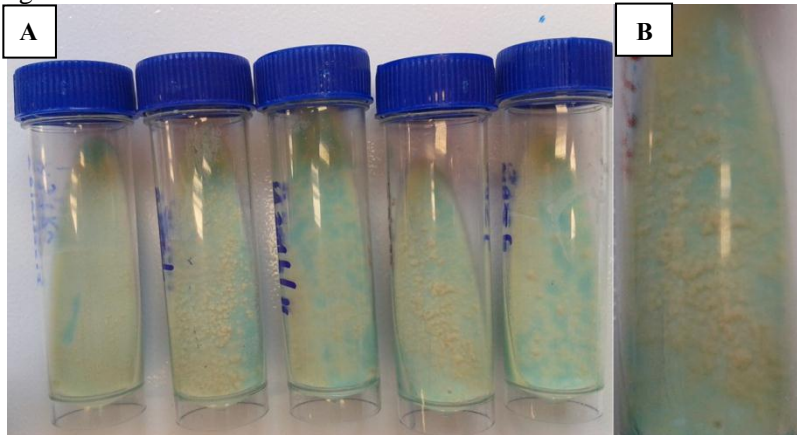
Entre as 92 amostras selecionadas, 53 eram MDR, 38 resistentes à INH e sensíveis à RMP e uma resistente à RMP e sensível à INH. O resultado do TSA para os quatro antimicrobianos testados (INH, RMP, EMB e SM) consta na Tabela 5.

Tabela 5. Relação do perfil de resistência fenotípico das amostras

Fármaco relacionado	Perfil de resistência	Número de amostras
INH	INH	31
	INH/EMB	3
	INH/SM	3
	INH/EMB/SM	1
RMP	RMP	1
INH/RMP	INH/RMP	41
	INH/RMP/EMB	8
	INH/RMP/SM	3
	INH/RMP/EMB/SM	1
TOTAL	—	92

Todos os 92 isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH e/ou RMP e os 12 isolados sensíveis a todos os fármacos testados tiveram crescimento satisfatório em meio sólido (Figura 3).

Figura 3: Crescimento do *M. tuberculosis* em tubo com meio sólido Ogawa-Kudoh.



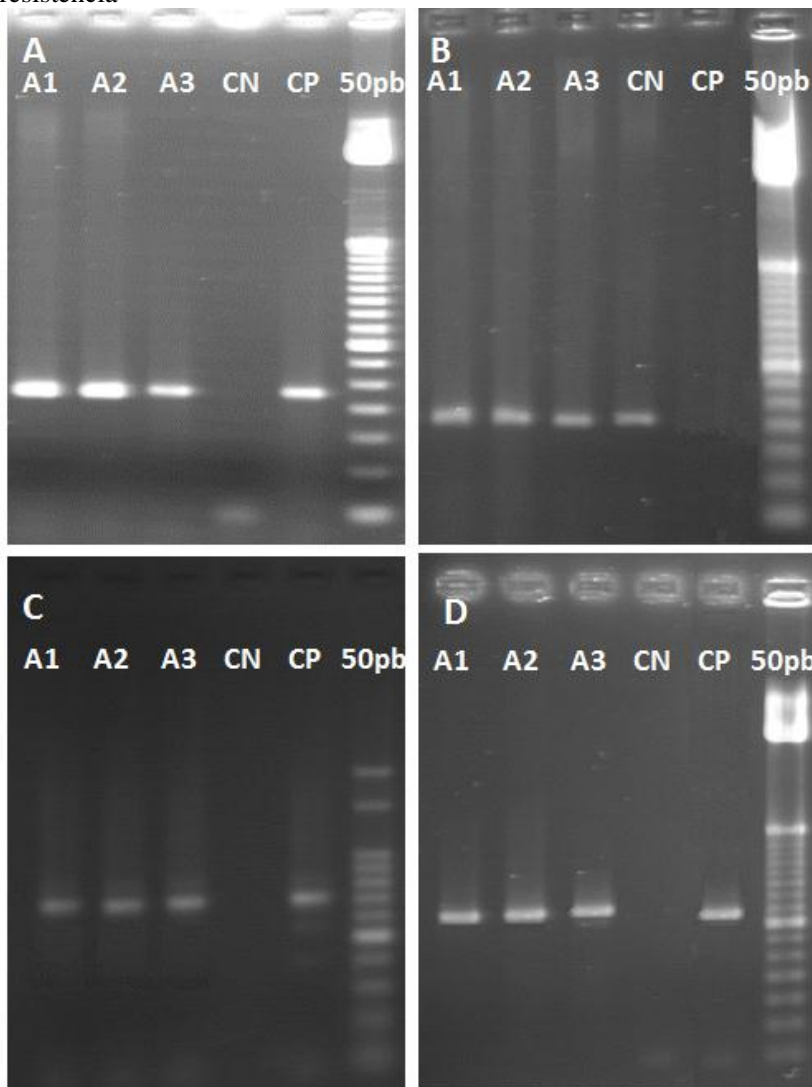
Legenda: A) Crescimento de vários isolados. B) Detalhe de um isolado.

5.2. PCR para genes de resistência

5.2.1. Análise do produto amplificado

As reações de PCR foram realizadas para cada um dos genes estudados e os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio (Figura 4). O tamanho do produto amplificado foi comparado com um marcador de tamanho molecular 50 pb *ladder* para confirmar a reação antes de ser enviado para o sequenciamento.

Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de PCR para os genes de resistência

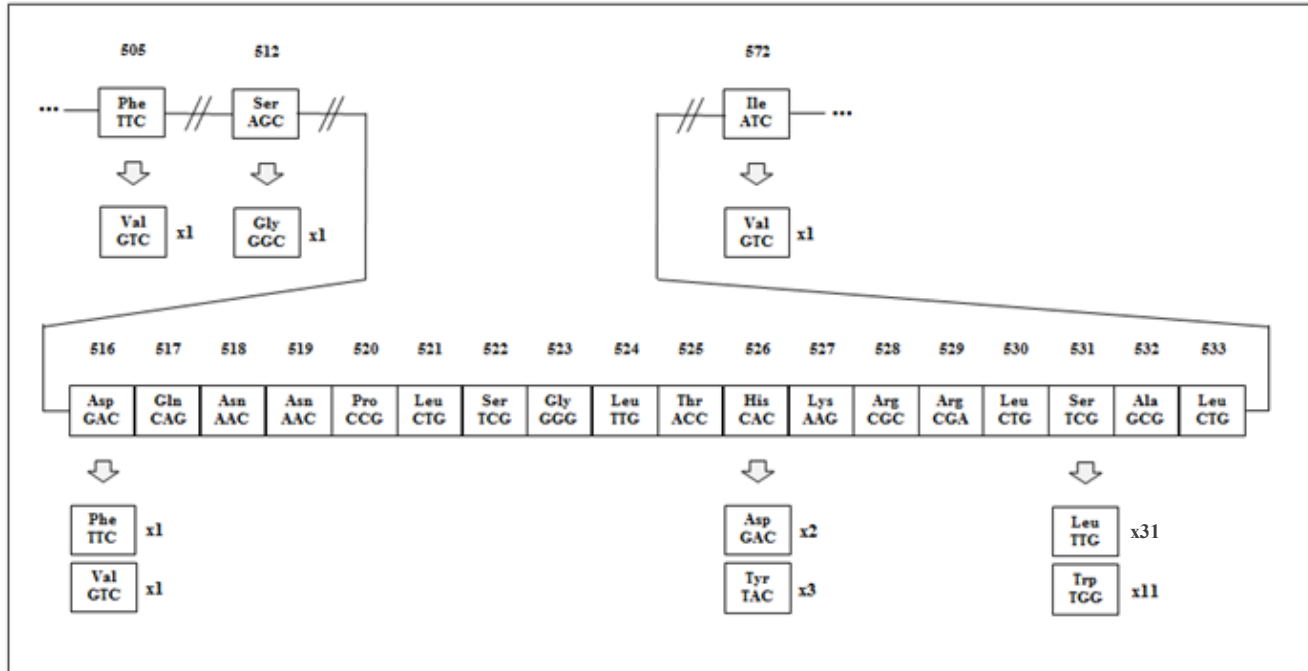


Legenda: A1, A2 e A3: Amostras de isolados clínicos. CP: Controle positivo da reação. CN: Controle negativo da reação. 50pb: Marcador de tamanho molecular 50 pb *ladder*. A) gene *katG* (produto de 233 pb). B) gene *inhA* (produto de 207 pb). C) gene *ahpC* (produto de 359 pb). D) gene *rpoB* (produto de 411 pb).

5.2.2. Sequenciamento

Foram encontradas 19 mutações diferentes em 82 isolados clínicos nas regiões sequenciadas dos quatro genes relacionados com resistência à INH e RMP (Figuras 5 e 6 e Tabela 6). Nenhuma mutação foi encontrada nos isolados clínicos sensíveis e na estirpe H37Rv.

Figura 6: Ilustração das mutações encontradas no gene *rpoB*, relacionado com resistência à RMP.



Legenda: Os números acima dos quadrados pretos contendo as seqüências e respectivos aminoácidos representam os códons e acima do retângulo preto contendo a seqüência parcial da região regulatória do gene *ahpC* representam a seqüência de bases.

Tabela 6: Mutações encontradas em 92 isolados clínicos resistentes provenientes do estado de Santa Catarina.

Resistência fenotípica (n)	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>ahpC</i>	<i>rpoB</i>	n
MDR (53)	S315T	-	-	S531L	19
	S315T	-	-	S531W	11
	S315T	-	-	H526Y	3
	S315T	-	-	H526D	2
	-	-	-	S531L	7
	S315T	-	-	-	1
	S315T	-	Ins(-47)T	S531L	1
	S315T	-	I6I	S531L	1
	S315T	-	-	D516F / F505V	1
	S315T	-	-	I572V	1
	-	-	-	D516V	1
	-	-	C(-57)T	S531L	1
	-	S94A	-	S512G / H526N	1
	-	-	G(-74)A	-	1
	-	-	Ins(-47)T	S531L	1
	-	-	G(-48)A	S531L	1
-	-	-	-	0	
INH (38)	S315T	-	-	NR	19
	S315I	-	-	NR	1
	-	-	C(-81)T	NR	2
	-	-	-	NR	15
	G279D	-	-	NR	1
RMP (1)	NR	NR	NR	-	1

Legenda: INH: isoniazida; RMP: rifampicina; NR: não realizado.

5.2.2.1. Mutações relacionadas à INH

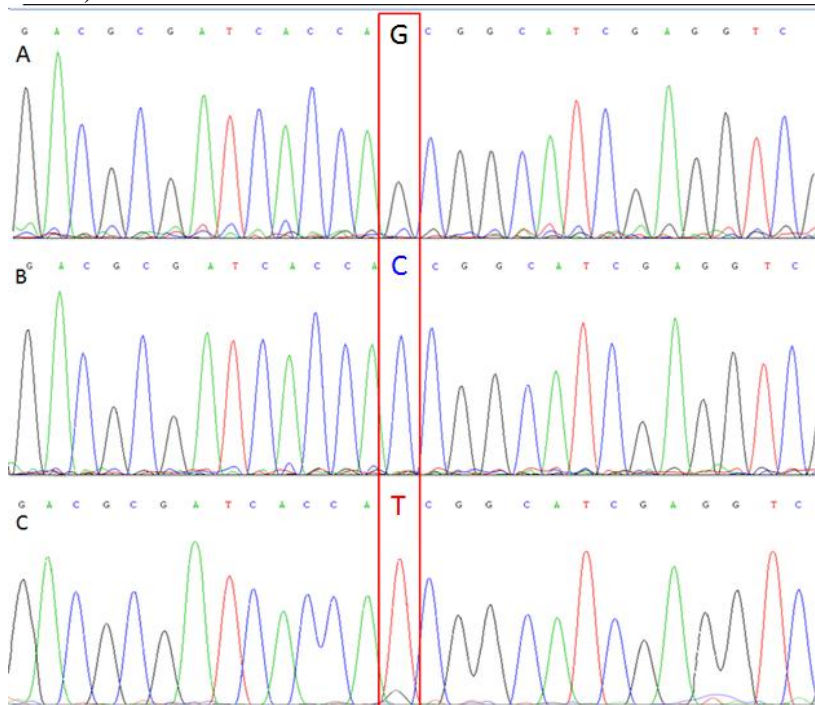
A mutação mais encontrada nos três genes foi a *katG* S315T, na qual o aminoácido (aa) serina (S) foi substituído pelo aa treonina (T) na posição 315 do gene, que estava presente em 59 dos 91 isolados resistentes. Outras mutações encontradas no mesmo gene foram S315I (1/91) na qual ocorre a substituição do aa serina pelo aa isoleucina (I) e a mutação G279D (1/91) por substituição de um aa glicina (G) pelo aa aspartato (D).

Apenas um isolado estava mutado na região sequenciada do gene *inhA*, que continha uma substituição do aa serina por um aa alanina (A) no códon 94 (S94A).

No gene *ahpC* foram encontradas seis mutações diferentes em oito isolados. A substituição de uma base nitrogenada (BN) citosina (C) por uma BN adenina (A) na posição -81 [C(-81)A] e a inserção de uma BN timina (T) na posição -47 [Ins(-47)T] foram encontradas em 2 isolados clínicos cada. Outras mutações foram a troca de uma BN guanina (G) por uma BN A na posição -74 [G(-74)A], a troca de uma BN C por uma BN T na posição -57 [C(-57)T], a troca de uma BN G por uma BN A na posição -48 [G(-48)A] e uma mutação silenciosa I6I, onde ocorreu a troca da sequência das BNs ATT por ATC, que codificam o aa isoleucina. Apenas dois isolados que continham alguma mutação no gene *ahpC* também continham no gene *katG*, entretanto um deles continha a mutação silenciosa (I6I).

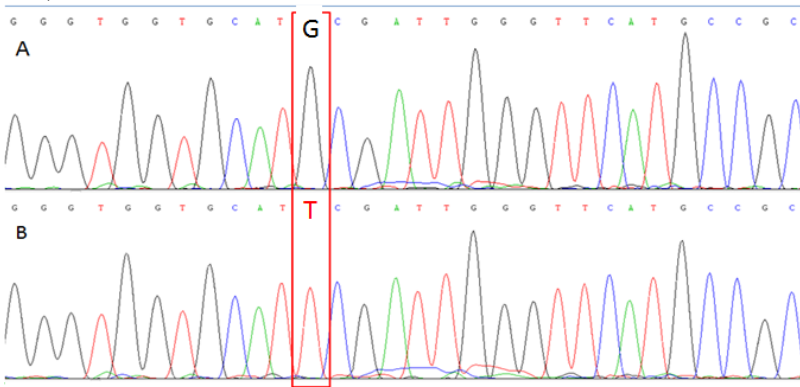
Nas figuras 7, 8 e 9 estão demonstrados os eletroferogramas das principais mutações encontradas nos genes *katG*, *inhA* e *ahpC*, respectivamente.

Figura 7: Eletroferograma da região parcial do gene *katG* (códon 311 ao 319).



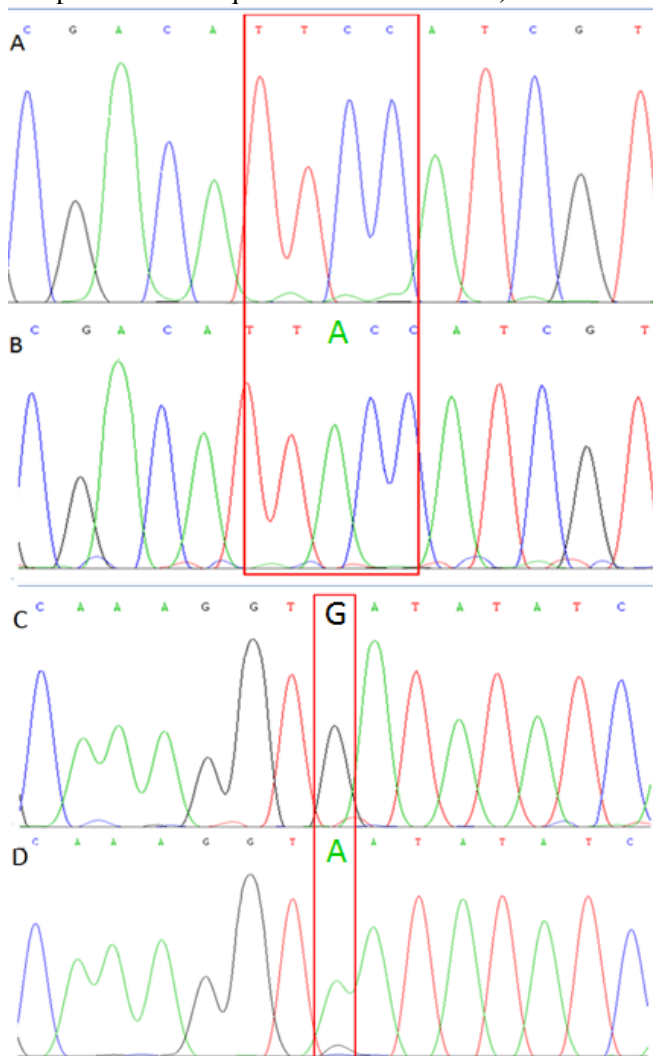
Legenda: A) sequência *wild-type*; B) sequência com a mutação S315T e C) sequência com a mutação S315I. A ordem e a cor dos picos indicam a sequência das bases nitrogenadas: verde: adenina, vermelho: timina, azul: citosina e preto: guanina. O retângulo vermelho indica a base nitrogenada substituída.

Figura 8: Eletroferograma da região parcial do gene *inhA* (códon 91 ao 100).



Legenda: A) sequência *wild-type*; B) sequência com a mutação S94A. A ordem e a cor dos picos indicam a sequência das bases nitrogenadas: verde: adenina, vermelho: timina, azul: citosina e preto: guanina. O retângulo vermelho indica a base nitrogenada substituída.

Figura 9: Eletroferograma da região parcial do gene *ahpC* (reverso complemento da sequência de BN -54 à -40).

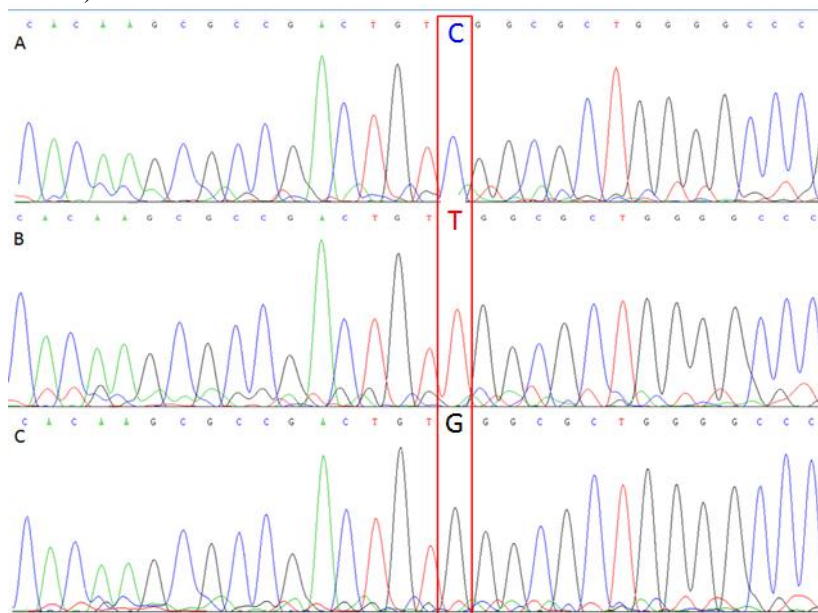


Legenda: A) sequência *wild-type* das bases nitrogenadas -54 a -40. B) sequência com mutação Ins(-47)T. C) sequência *wild-type* das bases nitrogenadas -74 a -88. D) sequência com mutação C(-81)T. A ordem e a cor dos picos indicam a sequência das bases nitrogenadas: verde: adenina, vermelho: timina, azul: citosina e preto: guanina. O retângulo vermelho indica a região onde a base nitrogenada foi inserida (A e B) e a base nitrogenada substituída (C e D).

5.2.2.2. Mutações relacionadas à RMP

Entre os 54 isolados clínicos resistentes à RMP, 51 tinham mutações no gene *rpoB*, sendo 42 delas no códon 531. A mutação mais encontrada foi a substituição S531L, na qual o aa serina é substituído pelo aa leucina (L), que estava presente em 31 isolados clínicos, seguida pela mutação S531W, com substituição do aa S pelo aa triptofano (W), que foi encontrada em 11 isolados clínicos. Outras mutações pontuais foram encontradas nos códons 516, 526 e 572. Em dois isolados clínicos foram encontradas 2 mutações diferentes no mesmo isolado [D516F/F505V, nas quais o aa aspartato (D) é substituído pelo aa fenilalanina (F) e o aa F é substituído pelo aa valina (V) e S512G / H526N, nas quais o aa S é substituído pelo aa glicina (G) e o aa histidina (H) é substituído pelo aa asparagina (N)]. Na figura 10 estão demonstrados os eletroferogramas das principais mutações encontradas no gene *rpoB*.

Figura 10: Eletroferograma da região parcial do gene *rpoB* (códon 526 ao 535).



Legenda: A) sequência *wild-type*; B) sequência com a mutação S531L e C) sequência com a mutação S531W. A ordem e a cor dos picos indicam a sequência das bases nitrogenadas: verde: adenina, vermelho: timina, azul: citosina e preto: guanina. O retângulo vermelho indica a base nitrogenada substituída

5.3. Spoligotyping

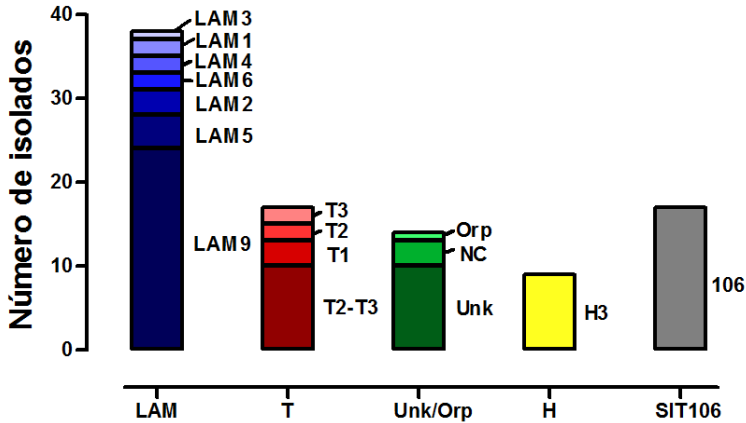
Entre os 92 isolados resistentes, 82 foram agrupados em 22 SITs diferentes. As demais amostras apresentaram perfis desconhecidos (9) e perfil *orphan* (1).

A família LAM foi a mais prevalente, com 38 isolados, seguida pela família T e SIT106, com 17 isolados cada e família H, com nove isolados. As estirpes pertencentes ao SIT106 foram analisadas separadamente porque esse SIT não está estritamente relacionado com nenhuma família bem-caracterizada (comunicação pessoal Dr. Nalin Rastogi).

O SIT mais encontrado foi o 106, com 17 isolados, seguido pelos SITs 42 (LAM9) com 15 isolados, 73 (T2-T3) com 10 isolados e 2263 (LAM9) e 50 (H3), com sete isolados cada.

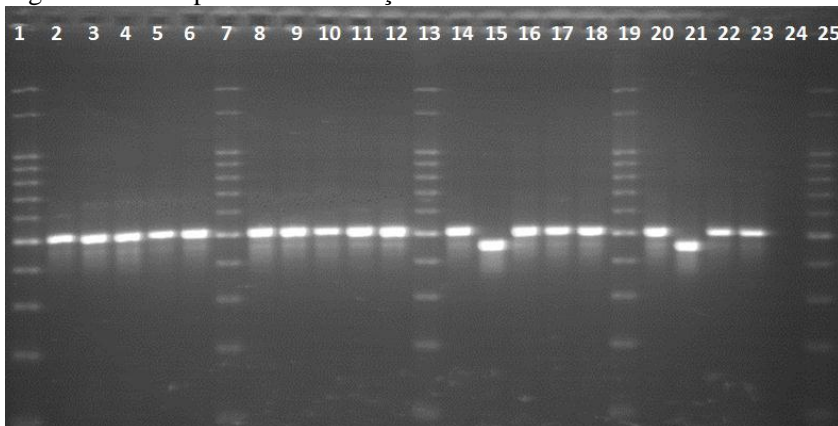
Os resultados agrupados por família e subfamília constam na figura 11 e os resultados completos do *spoligotyping* constam na Tabela 7.

Figura 11: Resultado agrupado das famílias de *spoligotyping* encontradas em 92 isolados resistentes à isoniazida e/ou rifampicina do estado de SC.



Legenda: LAM: *Latin America Mediterranean*. Unk: *unknown*. Orp: *orphan*. NC: Não classificadas. H: *Haarlem*

Figura 12: Exemplo de determinação do alelo do MIRU 2



Legenda: Canaletas 1, 7, 13, 19 e 25: padrão de tamanho molecular 100 pb *ladder*. Canaletas 2-6,8-12,14-18,20-22: isolados clínicos. Canaleta 23: H37Rv. Canaleta 24: controle negativo da reação.

Para a determinação dos alelos de cada MIRU foram utilizados 25 isolados resistentes. Para esses isolados foram obtidos 17 perfis diferentes de MIRU, sendo grande parte perfis únicos (Tabela 8)

Tabela 8: Perfis de MIRU obtidos

Perfil de MIRU	Número de isolados
1 2 3 3 _ 6 1 4 3 2 2 2	1
1 2 3 3 _ 6 1 5 3 3 2 2	1
1 2 3 3 _ 7 1 5 3 2 2 6	1
2 2 3 1 _ 6 1 5 2 3 2 1	1
2 2 3 1 _ 6 1 4 2 3 2 1	2
2 2 3 4 _ 6 1 4 0 3 2 1	1
2 2 4 1 _ 5 1 6 3 2 2 1	1
2 2 4 1 _ 6 1 5 2 3 2 1	7
2 2 4 2 _ 5 1 6 3 3 2 1	1
2 2 4 2 _ 6 1 1 2 3 2 1	1
2 2 4 2 _ 6 1 5 3 3 2 1	1
2 2 4 3 _ 5 1 1 3 2 2 1	1
2 2 4 3 _ 5 1 6 3 2 2 1	1
2 2 4 3 _ 6 1 5 3 3 2 1	1
2 2 4 4 _ 5 1 6 3 2 2 1	1
2 2 5 1 _ 6 1 5 2 3 2 1	1
2 2 5 3 _ 5 1 5 3 3 2 4	2

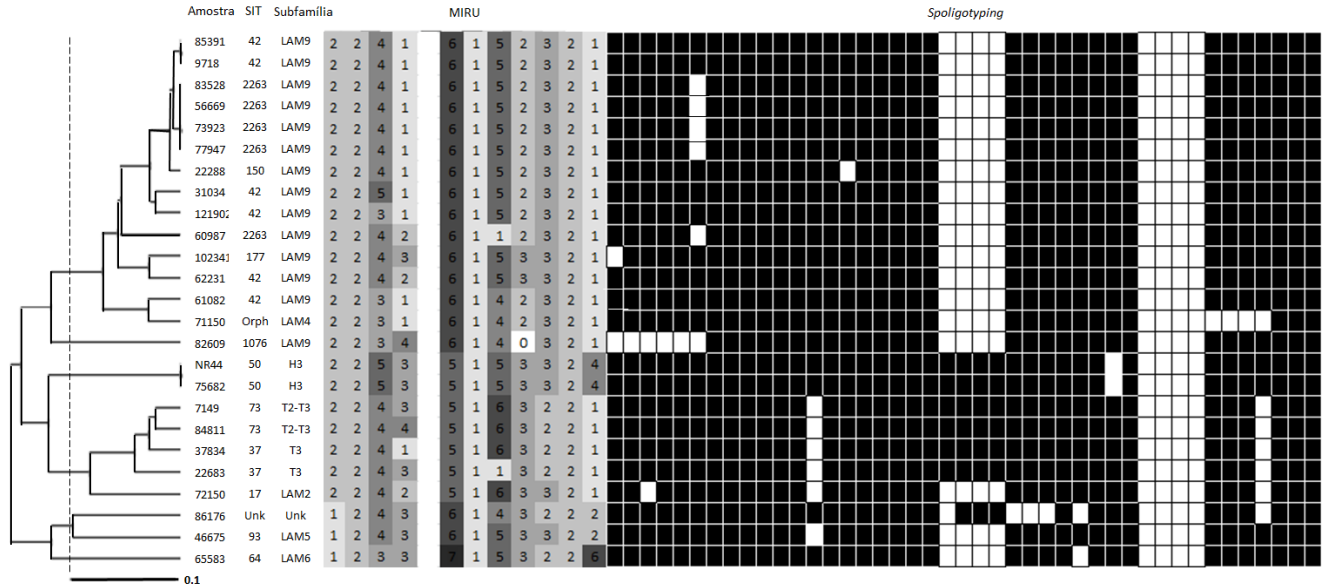
As maiores diversidades alélicas foram encontradas nos MIRUs 10, 16, 26 e 27 (HGDI > 0,503). Em contrapartida, nenhuma diversidade foi encontrada nos MIRUs 04, 24 e 39. O HGDI estimado, o número de alelos e o número de repetições para cada MIRU constam na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros relacionados à diversidade alélica para cada *loci* do MIRU

MIRU	Número de alelos	Número de repetições	HGDI
02	2	1-2	0,220
04	1	2	0,000
10	3	3-4-5	0,503
16	4	1-2-3-4	0,673
23	3	5-6-7	0,477
24	1	1	0,000
26	4	1-4-5-6	0,607
27	3	0-2-3	0,560
31	2	2-3	0,380
39	1	2	0,000
40	4	1-2-4-6	0,360

Para verificação da formação de GIRs e *clusters*, foi construído o dendograma de similaridade dos 25 isolados resistentes analisados pelo MIRU e *spoligotyping*. Dessa forma, foram obtidos três *clusters* e cinco GIRs. O primeiro *cluster* é formado por dois isolados da subfamília LAM9 – SIT 42. Quatro isolados da subfamília LAM9, porém SIT 2263, formam o segundo *cluster*. O terceiro *cluster* é formado por dois isolados do SIT 50, subfamília H3. Foram obtidos cinco GIRs entre os 25 isolados, conforme observado na Figura 13.

Figura 13: Análise combinada utilizando o dendograma de similaridade UPGMA de 25 isolados resistentes à INH e/ou RMP.



Legenda: A linha tracejada representa similaridade de 90%, definida como sendo o valor mínimo para os grupos de infecção recente

5.5. Associação entre as mutações nos genes de resistência e as famílias de *spoligotyping*

Para observar a associação entre as mutações nos genes de resistência e família do *spoligotyping* foram tomadas as três principais mutações encontradas: *katG* S315T, *rpoB* S531L e *rpoB* S531W.

A mutação *katG* S315T foi encontrada em todas as famílias de *spoligotyping*, mas com menor frequência na família T. Enquanto essa mutação estava presente em 64,8% do total de amostras, apenas 11,8% ($p < 0,001$) dos isolados da família T apresentavam a mutação *katG* S315T. Por outro lado, a família LAM ($p = 0,01$), em virtude do elevado número de mutações S315T no *spoligotype* LAM9 (87,5%), e o grupo SIT106 ($p = 0,05$) demonstraram uma associação positiva com essa mutação (Tabela 10).

Não houve correlação da mutação *rpoB* S531L com os *spoligotypes*. As prevalências dessa mutação nas famílias H, LAM e T e no grupo SIT106 variaram de 50,0 a 69,2% (Tabela 11).

Houve uma correlação positiva entre as mutações *rpoB* S531W e a família LAM ($p = 0,01$). Das 11 mutações *rpoB* S531W, 9 foram encontradas na família LAM e, mais especificamente, 6 dessas pertencem ao SIT 2263. Nas outras famílias e no grupo SIT106 a prevalência encontrada foi de 0,0 a 20,0% (Tabela 12).

Tabela 10: Associação entre famílias/SIT do *spoligotyping* e mutação no gene *katG* S315T

Família/SIT <i>spoligotyping</i>	<i>katG</i> S315T		
	mut	wt	p
SIT106	14	3	0,05*
não-SIT106	43	29	
Haarlem	8	1	0,09
não-Haarlem	51	31	
LAM	27	10	0,01*
não-LAM	32	33	
T	2	15	< 0,001*
não-T	57	17	
Unk/NC/Orp	9	3	0,21
não-unk/NC/Orp	53	29	

Legenda: mut: isolados mutados. wt: isolados *wild type*. unk: *unknown*. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p \leq 0,05$ calculado pelo teste exato de Fischer.

Tabela 11: Associação entre famílias/SIT do *spoligotyping* e mutação no gene *rpoB S531L*

Família/SIT <i>spoligotyping</i>	<i>rpoB S531L</i>		
	mut	wt	p
SIT106	10	4	0,12
não-SIT106	21	19	
Haarlem	3	2	0,36
não-Haarlem	28	21	
LAM	12	13	0,10
não-LAM	19	10	
T	3	1	0,33
non-T	28	22	
Unk/NC/Orp	3	3	0,31
não-unk/NC/Orp	28	20	

Legenda: mut: isolados mutados. wt: isolados *wild type*. unk: *unknown*. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p \leq 0,05$ calculado pelo teste exato de Fischer.

Tabela 12: Associação entre famílias/SIT do *spoligotyping* e mutação no gene *rpoB S531W*

Família/SIT <i>spoligotyping</i>	<i>rpoB S531W</i>		
	mut	wt	p
SIT106	1	13	0,10
não-SIT106	11	30	
Haarlem	0	5	0,30
não-Haarlem	11	38	
LAM	9	15	0,001*
não-LAM	2	27	
T	1	4	0,43
não-T	10	39	
Unk/NC/Orp	0	6	0,24
não-unk/NC/Orp	11	37	

Legenda: mut: isolados mutados. wt: isolados *wild type*. unk: *unknown*. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p \leq 0,05$ calculado pelo teste exato de Fischer.

6. DISCUSSÃO

A TB-MDR é uma ameaça global, visto que sua taxa de mortalidade é aproximadamente três vezes mais alta do que a TB sensível aos antimicrobianos (BLONDAL et al., 2013). No Brasil, a taxa de resistência primária é de 6,0% para a INH e 1,5% para a RMP e a taxa de MDR primária é de 1,4%. Entretanto, entre os casos com história de tratamento anterior a taxa de resistência à INH e RMP aumenta para 21,0% e 5,9% respectivamente, (BRAGA et al., 2003), o que demonstra a importância do diagnóstico etiológico e tratamento com o esquema recomendado para cada caso de TB.

Este foi o primeiro estudo em amostras clínicas de SC a buscar mutações em isolados de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos. Foram utilizados 92 isolados clínicos com variados perfis de resistência: 32 isolados monorresistentes (31 INH-R e um RMP-R), sete isolados polirresistentes e 53 isolados MDR. No mesmo período, de acordo com dados do SINAN, foram confirmados 8.430 casos de TB em SC. Desta forma, considerando-se a taxa de TB-MDR do Brasil (2,37%) (WHO, 2013), podem ser estimados cerca de 50 casos por ano, totalizando cerca de 200 casos de MDR-TB em SC no período do estudo. Há uma grande diferença entre os casos de TB-MDR estimados e notificados, visto que em 2008 e 2009 foram notificados apenas 15 casos por ano (DIVE, 2010). Esta diferença pode ocorrer devido à subnotificação de casos de TB-MDR, o que demonstra que outras estratégias de busca de isolados MDR devem ser adotadas.

Em nosso estudo foram encontradas 19 mutações pontuais diferentes em 81 dos 92 isolados clínicos resistentes, o que representa 88,0% dos isolados resistentes fenotipicamente analisados. A mutação *katG* S315T estava presente em 64,8% dos isolados resistentes à isoniazida. As frequências das mutações podem variar de acordo com a região geográfica (SILVA et al., 2003) e, como esperado, esse percentual está próximo às taxas encontradas em outros estudos do Brasil, que variam de 48,5% a 78,5% (CLEMENTE et al., 2008; CARDOSO et al., 2004; COSTA et al., 2009; HOFLING et al., 2005; SILVA et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2009; PERIZZOLO et al., 2012) exceto para isolados clínicos da região centro-oeste brasileira, onde são encontrados percentuais menores da mutação S315T em isolados resistentes à isoniazida (SANTOS et al., 2010; ALVES et al., 2011). Os estudos no Brasil demonstram um percentual próximo ao de países como Chile, Argentina, Turquia, Paquistão, Filipinas, Austrália, Iran, Vietnam, Costa do Marfim, Espanha, Arábia Saudita e China, que têm

taxas de 50 a 80% (ARAYA et al., 2011; IMPERIALE et al., 2012; ALI et al., 2011; ASLAN et al., 2008; HERRERA et al., 2004; LAVENDER et al., 2005; MOADDAB et al., 2011; MINH et al., 2012; N'GUESSAN et al., 2009; TORRES et al., 2002; VARGHESE et al., 2012; WANG et al., 2009; YUAN et al., 2012; ZHOU et al., 2011). Outros países como o Uruguai, EUA, México, Papua Nova Guiné e Coreia do Sul têm percentuais mais baixos de prevalência dessa mutação em isolados clínicos resistentes à INH, que se encontram entre 20 e 35% (GREIF et al., 2012; VARELA et al., 2008; GUO et al., 2006; BOLADO-MARTINEZ et al., 2012; BALIF et al., 2012; YOON et al., 2012). Em contrapartida, em alguns países são encontradas altas taxas da mutação S315T no gene *katG* (superiores a 90%) como Egito, Rússia, Tunísia, Cazaquistão, Colômbia e Etiópia (ABELAAL et al., 2009; AFANAS'EV et al., 2007; BEM-KAHLA et al., 2011; KOXHAMKULOV et al., 2011; MOKROUSOV et al., 2002; NIETO et al., 2012; TESSEMA et al., 2012).

Outras duas mutações foram encontradas no gene *katG*: S315I, que é encontrada em várias regiões do mundo, e G279D, que foi descrita em alguns estudos com isolados do Brasil e alguns outros países (STRAVUM et al., 2009; MORLOCK et al., 2003; WU et al., 2006).

Mutações no gene *katG* alteram a habilidade da enzima KatG em catalisar a conversão da isoniazida em ácido isonicotínico, que irá formar o aduto INH-NADH. Desta forma não haverá inibição pelo aduto INH-NADH da InhA, enzima que está envolvida na síntese de ácidos micólicos e é essencial à sobrevivência do bacilo (VILCHEZE, JACOBS, 2007). Por outro lado, como a enzima KatG também atua como um fator de virulência do bacilo, sabe-se que a atividade dessa enzima não é diminuída totalmente nas estirpes com a mutação *katG* S315T o que pode explicar o fato dessas estirpes terem sido disseminadas com sucesso (PYM, SAINT-JOANIS, COLE, 2002)

Apenas um isolado estava mutado na região estrutural do gene *inhA*, que não continha nenhuma outra mutação nas regiões pesquisadas. A mutação S94A foi uma das primeiras mutações a serem descritas no gene *inhA* e pode diminuir a força da interação entre o aduto NADH-INH, uma molécula de água e o sítio ativo da enzima InhA, que é responsável pela síntese da parede celular de *M. tuberculosis*, tornando a INH menos efetiva contra o bacilo (DESSEN et al., 1995; PANTANO et al., 2002). Machado e cols. (2013), em um estudo em Portugal com 17 isolados MDR, encontraram nove isolados com as mutações *inhA* S94A e *inhA* C(-15)T associadas, além de alto nível de resistência à INH e à etionamida nesses isolados.

Apesar das mutações na região estrutural do gene *inhA* poderem originar resistência à isoniazida, a maior parte delas são encontradas na sua região regulatória do gene, principalmente a mutação C(-15)T. Essas mutações podem diminuir a expressão da enzima InhA, que está envolvida na síntese de ácidos graxos, o alvo do derivado ativo da isoniazida (BANERJEE et al., 1994; COSTA et al., 2009). O sequenciamento da região regulatória do gene *inhA* pode aumentar a detecção de isolados mutados em nosso estudo, uma vez que 10-50% dos isolados resistentes à isoniazida têm mutações nessa região do gene (CARDOSO et al., 2004; COSTA et al., 2009; ALVES et al., 2011; GUO et al., 2006; BOLADO-MARTINEZ et al., 2012; CHIA et al., 2012; AFANAS'EV et al., 2007; BAKONYTE et al., 2009; BALIF et al., 2012).

O sequenciamento do gene *ahpC* demonstrou seis mutações diferentes em oito isolados clínicos (8,8%). Outros estudos realizados no Brasil mostraram resultados similares na detecção de mutações *ahpC* em geral, entretanto não há mutações predominantes nesse gene (CARDOSO et al., 2004; COSTA et al., 2009; SILVA et al., 2003). Por outro lado, há um baixo percentual de detecção de mutações no gene *ahpC* em estudos realizados na Alemanha, Coréia do Sul, Cazaquistão, Espanha, Papua Nova Guiné e Tunísia (BALIF et al., 2012; BEM-KAHLA et al., 2011; HILLEMANN et al., 2005; JNAWALI et al., 2013; KOXHAMKULOV et al., 2011; TORRES et al., 2002).

A relação entre às mutações nos genes *katG* e *ahpC* não é completamente entendida ainda. Apenas um isolado que continha uma mutação *missense* no gene *ahpC* também estava mutado no gene *katG* (outro isolado continha uma mutação silenciosa). Por este motivo, supõe-se que nos isolados utilizados no estudo a resistência à isoniazida originada pela mutação no gene *katG* não envolve mutações compensatórias no gene *ahpC* para aumentar a expressão da enzima AhpC, que poderia compensar a diminuição da atividade da enzima KatG contra o estresse oxidativo (SHERMAN et al., 1996; WILSON, COLLINS, 1996). Isso pode ser justificado devido ao alto percentual de mutações do tipo *katG* S315T, que requer da estirpe um baixo *fitness cost* quando comparado às estirpes que contém outras mutações que não a S315T (GAGNEUX et al., 2006; BALIF et al., 2012). Além disso, mutações na região promotora do gene *ahpC*, como as encontradas em neste estudo, são relatadas em isolados resistentes à isoniazida sem mutações no gene *katG* (ZHANG et al., 1996); algumas mutações na região promotora do gene *ahpC* causaram um aumento na atividade da enzima β -galactosidase de 6 a 10 vezes quando esse gene foi ligado a

um plasmídeo contendo o gene *lacZ*, o que contribui para a hipótese de que o gene *ahpC* pode estar envolvido na resistência à isoniazida sem necessariamente depender do gene *katG* (WILSON, COLLINS, 1996).

Foram sequenciadas regiões parciais de 3 genes envolvidos na resistência à isoniazida, porém mutações de mais de 20 genes podem originar resistência (SANDGREN et al., 2009). Além disso, quanto menor o valor da concentração inibitória mínima (CIM), menor o percentual de mutações nos genes *katG*, *inhA* e *ahpC*, mostrando que as estirpes com CIM baixa podem possuir algum outro mecanismo de resistência (COSTA et al., 2009). Portanto a determinação da CIM pode contribuir para o estudo dos mecanismos nos isolados de SC.

As análises das mutações no gene *rpoB* demonstraram 10 mutações diferentes em 94,4% dos isolados resistentes. Quase todos os isolados resistentes à RMP no teste fenotípico eram MDR (98,1%), o que demonstra que, assim como em outros estudos, a detecção de mutações no gene *rpoB* foi um bom marcador de MDR nos isolados do nosso estudo (TELENTI et al., 1993; SAM et al., 2006). Trocas simples de bases nitrogenadas no códon 531 foram responsáveis por 77,8% do total de mutações no gene *rpoB*. A mutação S531L foi a mais prevalente, encontrada em 57,4% dos isolados resistentes à RMP, o que está em concordância com vários outros estudos do Brasil (HOFLING et al., 2005; PERIZZOLO et al., 2012; SPINDOLA DE MIRANDA et al., 2011) e de outros países (BOLOTIN et al., 2009; IMPERIALE et al., 2012; ALI et al., 2011; HILLEMANN et al., 2005; JNAWALI et al., 2013; KOUROUT et al., 2009; POUDEL et al., 2012; PRAMMANANAN et al., 2008; RAHIM et al., 2012; TANG et al., 2013; WANG et al., 2013), que reportam um percentual entre 40 e 70%. Por outro lado, estudos do centro-oeste do Brasil (SANTOS et al., 2010; ALVES et al., 2011) e de outros países como Cazaquistão, Espanha e Rússia demonstraram um percentual de mais de 70% da mutação S531L em isolados resistentes à RMP (KOXHAMKULOV et al., 2011; TORRES et al., 2002; LIPIN et al., 2007). A segunda mutação mais prevalente no gene *rpoB* foi a S531W, que estava presente em 20,4% dos isolados resistentes à RMP. Araya e cols. (2011) encontraram um percentual de 24,0% em isolados resistentes do Chile. Em outro estudo realizado no Brasil com 14 isolados resistentes à RMP foi encontrado um percentual de 14,3% da mutação S531W (CLEMENTE et al., 2008). Por outro lado, vários estudos com um número maior de isolados resistentes à RMP de outras regiões do Brasil e de outros países demonstraram que menos do que 10% dessa mutação ocorreu nesses isolados (CAVUSOGLU et al., 2002; KHAN et al., 2013; KOUROUT

et al., 2009; KOXHAMKULOV et al., 2011; LEE et al., 2005; MADANIA et al., 2012; RAHIM et al., 2012; TANG et al., 2013; BODMER et al., 1995).

O *spoligotyping* é um método rápido simples e robusto que pode ser utilizado na detecção e tipagem de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, ou seja, nas micobactérias que possuam região *Direct Repeat* (DR) (KANDUMA et al., 2003). Com a análise da presença ou ausência de 43 espaçadores é possível diferenciar os isolados em famílias e subfamílias, o que possibilita a caracterização da diversidade genética de *M. tuberculosis* (TANG et al., 2008).

Apesar de ser referido como um método de razoável poder discriminatório, foram encontrados 24 perfis diferentes de *spoligotyping*, além de sete perfis *unknown* e dois *orphan* nos 92 isolados resistentes analisados. A família LAM foi a mais encontrada entre os perfis de *spoligotyping* com 41,3%, seguida pelas famílias T e Haarlem, com 18,5% e 9,8%, respectivamente. Estas três principais famílias representam 69,6% dos isolados resistentes e encontram-se em quantitativo inferior ao esperado para os isolados da América do Sul, visto que no banco SITVITWEB as famílias LAM, T e Haarlem somam mais de 90% dos isolados da região Sul-Americana (DEMAY et al., 2012). Os cinco principais SITs (106, 42, 73, 50 e 2263) englobaram cerca de 60% dos isolados. O percentual restante representa todos os outros SITs, que tiveram três ou menos isolados. Estes dados demonstram uma grande variabilidade genética das estirpes resistentes circulantes no estado de SC. O SIT106 não foi agrupado porque não se relaciona estritamente com nenhuma família bem caracterizada. No banco de estirpes publicado em 2006, SpolDB4, o SIT106 encontrava-se na subfamília U(likelyH3), porém foi recolocado como *unknown* na última revisão banco de dados de *spoligotyping*, SITVITWEB. Portanto outros métodos de tipificação para reclassificação dos isolados deste SIT são recomendados (BRUDEY et al., 2006; DEMAY et al., 2012; RASTOGI, 2013).

O resultado do HGDI mostrou que alguns *loci* do MIRU possuem uma diversidade moderada, enquanto outros não possuem diversidade.

Os *loci* MIRU10, MIRU16, MIRU23, MIRU26 e MIRU27 destacaram-se como os melhores marcadores em nossas amostras, visto que apresentaram três ou quatro alelos diferentes cada um e HGDI \geq 0,477. Foram encontrados quatro alelos diferentes para o MIRU40, porém, pelo fato de haver pouca variabilidade (a maioria dos isolados possui apenas uma repetição) seu HGDI foi de 0,360.

Espera-se encontrar uma baixa variabilidade em alguns loci do MIRU, por exemplo, MIRU24 e MIRU39, que possuem baixa variabilidade no mundo inteiro (observado principalmente para a família LAM, que compõe a maioria dos nossos isolados) de acordo com o banco de dados SITVITWEB. Porém, no mesmo banco de dados o MIRU4 é encontrado com moderada diversidade (DEMAY et al., 2012), enquanto nesse estudo não foi encontrada variabilidade. Um aspecto que pode limitar nossa análise é o pequeno número de isolados utilizados, podendo subestimar o HGDI de alelos com nenhuma ou baixa diversidade.

Na análise combinada entre *spoligotyping* e MIRU foram formados três *clusters* e cinco GIR. O primeiro GIR abrange mais da metade dos isolados e refere-se ao grupo formado principalmente pela subfamília LAM9 (13 isolados) e um isolado da subfamília LAM4, que possui aproximadamente 97% de similaridade com os outros isolados do mesmo GIR. Dentro desse primeiro GIR há um *cluster* formado por dois isolados do SIT 42 e outro *cluster* formado por quatro isolados do SIT 2263. O segundo GIR é formado por apenas um isolado da subfamília LAM9 (SIT 1076), que se diferencia do primeiro GIR por apresentar ausência dos primeiros espaçadores de *spoligotyping*, quando comparado à maioria dos isolados do primeiro GIR, e dois alelos do MIRU totalmente diferentes dos demais isolados da família LAM (MIRU 16 e MIRU 27). Os dois isolados da família *Haarlem*, subfamília H3, formam o terceiro GIR e o terceiro *cluster*, que ficaram caracterizados pela ausência do 31º espaçador no *spoligotyping* e presença dos alelos 5 e 4 nos MIRUs 10 e 40, respectivamente. O quarto GIR apresenta ausência dos espaçadores 13 e 40 do *spoligotyping* e, assim como o terceiro GIR, presença do alelo 5 no MIRU 16. Este GIR abrange todos os quatro isolados da família T (subfamília T3 e subfamília ambígua T2-T3) e um isolado da subfamília LAM2. O quinto GIR é formado por um isolado da subfamília LAM5 e um isolado *unknown*, que são similares em pouco mais de 90%. O isolado restante, da subfamília LAM6, não foi relacionado com nenhum outro isolado.

Em todas as famílias de *spoligotyping* foi encontrada a mutação *katG* S315T, porém destaca-se a correlação negativa com a família T. Entre os 17 isolados desta família, apenas dois apresentaram o gene *katG* mutado (11,8%). Desta forma, outros mecanismos de resistência parecem estar presentes nestes isolados. A determinação da CIM e a pesquisa de mutações na região promotora do gene *inhA* como, por exemplo, a mutação C(-15)T, podem auxiliar na determinação do mecanismo de resistência nesses isolados, visto que a mutação *inhA* C(-

15)T é a segunda mais prevalente em INH-R (BOLOTIN et al., 2009) e está relacionada com isolados com um baixo nível de resistência (BANG et al., 2010), ao contrário da mutação *katG* S315T que é detectada em isolados com níveis elevados de resistência (DANTES et al., 2012; IMPERIALE et al., 2013).

Vários estudos buscam observar a relação entre o perfil de resistência e o perfil filogenético (HAEILI et al., 2013; MARDASSI et al., 2005; HOVE et al., 2012; ANH et al., 2000). Os isolados da família Beijing, por exemplo, são frequentemente associados a surtos causados por MDR-TB (ALMEIDA et al., 2005; DROBNIOWSKI et al., 2005; KUBICA et al., 2005). Porém, são poucos os estudos que relacionam as mutações em isolados resistentes aos antimicrobianos e o perfil filogenético.

Costa e col. (2009) em um estudo com 32 isolados da família *Harleem* e 192 isolados de outras famílias de países da América do Sul encontraram uma correlação entre a mutação S315T e a família *Haarlem*. Em nosso estudo, apesar de haver uma tendência ($p=0,09$) e a mutação ter sido encontrada quase cinco vezes mais em isolados da família *Haarlem*, não foi encontrada a mesma correlação, o que pode ter ocorrido devido ao baixo número de isolados dessa família ($n=9$). Por outro lado, foi encontrada uma correlação entre a família LAM ($p<0,001$) e o SIT106 ($p=0,05$) com a mutação S315T.

Não houve correlação entre a mutação S531L e as famílias de *spoligotyping*, já que, apesar de ser a mutação mais encontrada nos isolados, as prevalências dessa mutação apresentaram taxas próximas entre as famílias, variando de 48,0 a 71,4%.

A mutação S531W foi a segunda mais encontrada no gene *rpoB*, principalmente devido ao SIT 2263 da subfamília LAM9. Do total de sete amostras pertencentes ao SIT2263, seis estavam com a mutação *rpoB* S531W, o que demonstra a provável disseminação clonal. Entre os seis isolados, foi possível rastrear no Sistema de Agravos de Notificação - SINAN, os locais de origem de quatro isolados que são provenientes das cidades de São Francisco do Sul (um isolado), Joinville (dois isolados) e Palhoça (um isolado). Os resultados do MIRU-12 desses quatro isolados demonstraram que os três casos da mesma região de SC (dois casos de Joinville e um caso de São Francisco do Sul) possuem exatamente o mesmo padrão dos 11 alelos de MIRU-12, que contribui para a hipótese de que esse isolado propagou-se com sucesso na região nordeste de SC, principalmente por tratar-se de um isolado resistente, com a mutação S531W, que exige um custo biológico da bactéria (MARIAM et al., 2004). O outro isolado genotipado, que foi detectado

na cidade de Palhoça, na região da Grande Florianópolis, apresenta apenas dois alelos diferentes do MIRU12, resultando uma alta similaridade com o padrão dos três outros isolados (*Spoligotyping* e MIRU). Entre esses quatro casos, um deles está cadastrado como resistência adquirida, no programa sitetb.org e os outros três estão cadastrados como resistência primária. Desta forma, as técnicas moleculares aplicadas no estudo puderam auxiliar no esclarecimento da origem das infecções.

O diagnóstico rápido da resistência é essencial para o manejo clínico da TB e minimizar a transmissão de MDR e XDR-TB (CHOI et al., 2010). O tempo médio laboratorial da detecção da resistência utilizando métodos moleculares pode ser reduzido pela metade (JACOBSON et al., 2012). Cabe salientar que o equipamento GeneXpert TB (Cepheid) será implementado na rotina dos laboratórios estaduais de referência para TB, inclusive no LACEN/SC. Esse equipamento utiliza um teste baseado em amplificação de ácidos nucleicos (*NAAT – Nucleic acid amplification test*) que não necessita de manipulação direta da amostra como os testes convencionais e que, além de detectar a presença do bacilo da TB em amostras de escarro, também detecta as principais mutações na região determinante de resistência à RMP (*RRDR – Rifampin Resistance-Determining Region*) com boas sensibilidade e especificidade (HELB et al., 2010). Este estudo confirma a utilidade da implantação, uma vez que a maioria das amostras resistentes à RMP, que engloba quase todos os isolados MDR, encontra-se mutada nos códons em que essa metodologia detecta. Ainda assim, no Brasil a taxa de resistência à INH é aproximadamente quatro vezes maior do que a taxa de MDR (WHO, 2013), por esse motivo o TSA em meio líquido ou sólido deverá continuar sendo utilizado nos laboratórios associados à metodologia GeneXpert TB uma vez que a detecção de resistência mais precoce (somente à INH) pode desencadear medidas intensivas de controle da adesão ao tratamento e prevenir a seleção de estirpes MDR.

7. CONCLUSÃO

A mutação mais prevalente nos isolados resistentes à INH foi a *katG* S315T, encontrou-se apenas uma mutação no gene *inhA* e 6 mutações diferentes em *ahpC*;

No gene *rpoB*, relacionado à resistência à RMP, as mutações mais prevalentes foram S531L e S531W;

O *spoligotyping* identificou 24 SITs diferentes, sete perfis desconhecidos (*unknown*) e dois perfis *orphan*;

Entre os perfis de *spoligotyping* 17 correspondem ao SIT 106 (não relacionado à família), 16 pertencem à subfamília LAM 9 (SIT 42), dez à subfamília T2-T3 (SIT 73), sete à subfamília H3 (SIT 50), sete à subfamília LAM 9 (SIT 2263). Os outros perfis continham três ou menos isolados;

Foram encontrados 17 perfis diferentes nos 25 isolados tipados pelo MIRU;

Foram encontradas correlações entre o SIT 106 ($p = 0,05$), família LAM ($p = 0,01$) e família T ($p < 0,001$);

Foi encontrada correlação entre a mutação *rpoB* S531W com a família LAM ($p = 0,01$);

A mutação *rpoB* S531W relacionada ao SIT 2263 da subfamília LAM9 demonstrou provável disseminação clonal, especialmente pelo padrão dos alelos encontrado no MIRU-12.

8. PERSPECTIVAS

Algumas perspectivas para os próximos projetos são:

- Sequenciar parte da região regulatória do gene *inhA* para verificar mutações envolvidas com a resistência à INH;
- Fazer o MIRU 20 dos isolados já tipados pelo MIRU e o todos os MIRUs dos isolados resistentes restantes;
- Fazer a concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados e buscar possíveis correlações com as mutações encontradas.

REFERÊNCIAS

ABDELAA, A.; EL-GHAFFAR, H. A.; ZAGHLOUL, M. H. E.; EL MASHAD, N.; BADRAN, E.; FATHY, A. Genotypic detection of rifampicin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by DNA sequencing: a randomized trial. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 4, 2009.

AFANAS'EV, M. V.; IKRYANNIKOVA, L. N.; IL'INA, E. N.; SIDORENKO, S. V.; KUZ'MIN, A. V.; LARIONOVA, E. E.; SMIRNOVA, T. G.; CHERNOUSOVA, L. N.; KAMAEV, E. Y.; SKORNIKOV, S. N.; KINSHT, V. N.; CHEREDNICHENKO, A. G.; GOVORUN, V. M. Molecular characteristics of rifampicina- and isoniazida-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 1057-1064, 2007.

ALI, A.; HASAN, R.; JABEEN, K.; JABEEN, N.; QADEER, E.; HASSAN, Z. Characterization of Mutations Conferring Extensive Drug Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Pakistan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5654-5659, 2011.

ALMEIDA, D.; RODRIGUES, C.; ASHAVID, T. F.; LALVANI, A.; UDWADIA, Z. F.; MEHTA, A. High Incidence of the Beijing Genotype among Multidrug-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in a Tertiary Care Center in Mumbai, India. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 881-886, 2005.

ALVES, S. L. A.; METZKER, F. S.; ARAÚJO-FILHO, J. A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. Clinical data and molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from drug-resistant tuberculosis patients in Goiás, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 655-661, 2011.

American Thoracic Society. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 1376-1395, 2000.

ANH, D. D.; BORGDORFF, M. W.; VAN, L. N.; LAN, N. T. N.; VAN GORKOM, T.; KERMER, K.; VAN SOOLINGER, D. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype Emerging in Vitnam. **Emerging Infectious Diseases**, n. 6, n. 3, p. 302-305, 2000.

ARAYA, P.; VELASCO, M.; TOGNARELLI, J.; ARIAS, F.; LEIVA, T.; SCCAPATTICIO, A.; ALVIZ, P.; FERNÁNDEZ, J. Detección de mutaciones asociadas a cepas multidrogo resistente de *Mycobacterium tuberculosis* em Chile. **Revista Médica de Chile**, v. 139, p. 467-473, 2011.

ARISTIMUÑO, L.; ARMENGOL, R.; CEBOLLADA, A.; ESPAÑA, M.; GUILARTE, A.; LAFOZ, C.; LEZCANO, M. A.; REVILLO, M. J.; MARTÍN, C.; RAMÍREZ, C.; RASTOGI, N.; ROKAS, J.; SALAS, A. V.; SOLA, C.; SAMPER, S. Molecular characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the First National Survey of Anti-tuberculosis Drug Resistance from Venezuela. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 90, 2006.

ASLAN, G.; TEZCAN, S.; SERIN, M. S.; EMEKDAS, G. Genotypic Analysis of Isoniazid and Rifampin Resistance in Drug-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates in Southern Turkey. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 255-260, 2008.

BALIF, M.; HARINO, P.; LEY, S.; COSCOLLA, M.; NIEMANN, S.; CARTER, R.; COULTER, C.; BORRELL, S.; SIBA, P.; PHUANUKOONNON, S.; GAGNEUX, S.; BECK, H. Drug resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* from Madang, Papua New Guinea. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 191, 2012.

BALONYTE, D.; BARANAUSKAITE, A.; CICENAITE, J.; SOSNOVSKAJA, A.; STAKENAS, P. Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Lithuania. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 2009-2011, 2003.

BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; UM, K. S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; LISLE, G.; JACOBS Jr. W R. *inhA*, a Gene Encoding a Target for

Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v.263, p. 227-230, 1994.

BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 1149-1156, 2003.

BARRERA, L. Chapter 3: The Basics of Clinical Bacteriology. In: PALOMINO, Juan Carlos; LEÃO, Sylvia Cardoso; RITACCO, Viviana (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Antuérpia, São Paulo, Buenos Aires, 2007.

BÁRTFAL, Z.; SOMOSKÖVI, A.; KÖDMÖN, C.; SZABÓ, N.; PUSKÁS, E.; KOSZTOLÁNYI, L.; FARAGÓ, E.; MESTER, J.; PARSONS, L. M.; SALFINGER, M. Molecular Characterization of Rifampin-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA Sequencing and the Line Probe Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 10, p. 3736-3739, 2001.

BEN KAHLA, I.; MARZOUK, M.; HENRY, M.; BEDOTTO, M.; COHEN, BACRIE, S.; BEN SELMA, W.; BOUKADIDA, J.; DRANCOURT, M. Molecular Characterisation of isoniazid- and rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Central Tunisia. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 15, n. 12, p. 1685-1687, 2011.

BLANCHARD, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 65, p. 215-239, 1996.

BLONDAL, K.; RAHU, K.; ALTRAJA, A.; VIKLEPP, P.; RAHU, M. Overall and cause-specific mortality among patients with tuberculosis and multidrug-resistant tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 17, n. 7, p. 961-968, 2013.

BODMER, T.; ZÜRCHER, G.; IMBODEN, P.; TELENTI, A. Mutation position and type of substitution in the β -subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, p. 345-348, 1995.

BOLADO-MARTINEZ, E.; PÉREZ-MENDOZA, A.; ALEGRÍA-MORQUECHO, F. M.; CANDIA-PLATA, M. C.; AGUAYO-VERDUGO, M. R.; ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, G. A. Mutaciones asociadas com resistência a rifampicina o isoniazida em aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de Sonora, México. **Salud Pública de México**, v. 54, n. 2, p. 167-170, 2012.

BOLOTIN, S.; ALEXANDER, D. C.; CHEDORE, P.; DREWS, S. J.; JAMIESON, F. Molecular characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ontario, Canada. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 263-266, 2009.

BRAGA, J. U.; BARRETO, A. M.; HIJAR, M. A. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995-97, IERDTB. Parte III: Principais resultados. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v.11, n. 1, p. 76-81, 2003.
BRASIL. Guia de Vigilância Epidemiológica. Caderno 7. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância de Saúde. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil, 2011

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, 2008.

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J. R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W. M.; GORI, A.; AL-HAJOJ, S.; ALLIX, C.; ARISTIMUÑO, L.; ARORA, J.; BAUMANIS, V.; BINDER, L.; CAFRUNE, P.; CATALDI, A.; CHEONG, S.; DIEL, R.; ELLERMEIER, C.; EVANS, J. T.; FAUVILLE-DUFAUX, M.; FERDINAND, S.; VIEDMA, D. G.; GARZELLI, C.; GAZZOLA, L.; GOMES, H. M.; GUTTIEREZ, M. C.; HAWKEY, P. M.; VAN HELDEN, P. D.; KADIVAL, G. V.; KREISWIRTH, B. N.; KREMER, K.; KUBIN, M.; KILKARNI, S. P.; LIENS, B.; LILLEBAEK, T.; LY, H. M.; MARTIN, C.; MARTIN, C.; MOKROUSOV, I.; NARVSKAIA, O.; NGEOW, Y. F.; NAUMANN,

L.; NIEMANN, S.; PARWATI, I.; RAHIM, Z.; RASOLOFO-RAZANAMPARANY, V.; RASOLONAVALONA, T.; ROSSETTI, M. L.; RÜSCH-GERDES, S.; SAJDUDA, A.; SAMPER, S.; SHEMYAKIN, I. G.; SINGH, U. B.; SOMOSKOVI, A.; SKUCE, R. A.; VAN SOOLINGEN, D.; STREICHER, E. M.; SUFFYS, P. N.; TORTOLI, E.; TRACEVSKA, T.; VINCENT, V.; VICTOR, T. C.; WARREN, R. M.; YAP, S. F.; ZAMAN, K.; PORTAELS, F.; RASTOGI, N.; SOLA, C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: minig the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 23, 2006.

BURGOS, M. V.; PYM, A. S. Molecular epidemiology of tuberculosis. **European Respiratory Journal**, v. 20, n. 36, p. 54s-65s, 2002.

CANETTI, G.; FOX, W.; KHOMENKO, A.; MAHLER, H. T.; MENOM, N. K.; MITCHISON, D. A.; RIST, N.; SMELEY, N. A. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 41, p. 21-43, 1969.

CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J.; HAUDURROY, P.; LANGEROVA, M.; MAHLER, H. T.; MEISSNER, G.; MITCHISON, D. A.; SULA, L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 29, p. 565-578, 1963.

CARDOSO, R. F.; CARDOSO, M. A.; LEITE, C. Q. F.; SATO, D. N.; MAMIZUKA, E. M.; HIRATA, R. D. C.; MELLO, F. F.; HIRATA, M. H. Characterization of *ndh* gene of isoniazida resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 59-61, 2007.

CARDOSO, R. F.; COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G. P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C. Q. F.; SATO, D. N.; SHIKAMA, M. L.; MAMIZUKA, E. M.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H. Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3373-3381, 2004.

CAVUSOGLU, C.; HILMIOGLU, S.; GUNERI, S.; BILGIC, A. Characterization of *rpoB* mutations in Rifampin-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA Sequencing and Line Probe Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4435-4438, 2002.

CHIA, B.; LANZAS, F.; RIFAT, D.; HERRERA, A.; KIM, E. Y.; SAILER, C.; TORRES-CHAVOLLA, E.; NARAYANASWAMY, P.; EINARSSON, V.; BRAVO, J.; PASCALE, J. M.; IORGER, T. R.; SACHETTINI, J. C.; KARAKOUSIS, P. C. Use of Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) to Detect Multidrug-Resistant Tuberculosis in Panama. **Plos One**, v. 7, n. 7, p. e40456, 2012.

CHIEN, H. P.; YU, M. C.; WU, M. H.; LIN, T. P.; LUH, K. T. Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Löwensteins-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. 9, p. 866-870, 2000.

CHOI, G. E.; LEE, S. M.; YI, J.; HWANG, S. H.; KIM, H. H.; LEE, E. Y.; CHO, E. H.; KIM, J. H.; KIM, H. J.; CHANG, C. L. High-Resolution Melting Curve Analysis for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 3893-3898, 2010.

CHOPRA, I.; BRENNAN, P. Molecular action of anti-mycobacterial agents. **Tubercle and Lung Disease**, v. 78, n. 2, p. 89-98, 1998.

CLEMENTE, W. T.; LIMA, S. S. S.; PALACI, M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. F. S.; COSTA, E. R. D.; POSSUELO, L.; CAFRUNE, P. I.; RIBEIRO, F. K.; GOMES, H. M.; SERUFO, J. C. Phenotypic and genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, p. 199-204, 2008.

COHEN, T.; SOMMERS, B.; MURRAY, M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Lancet Infectious Diseases**, n. 3, p. 13-21, 2003.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKILL, J.; GARNIER, T.;
 CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.;
 GAS, S.; BARRY III, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM,
 D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.;
 DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.;
 HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN,
 J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL,
 M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER,
 J.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.;
 TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the
 biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome
 sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-544, 1998.

COMSTOCK, G. W.; DANIEL, T. M.; SNIDER, D. E. The tuberculin
 skin test. **American Review of Respiratory Disease**, v. 124, p. 356-
 363, 1981.

COSTA, E. R. D.; RIBEIRO, M. O.; SILVA, M. S. N.; ARNOLD, L.
 S.; ROSTIROLLA, D. C.; CAFRUNE, P. I.; ESPINOZA, R. C.;
 PALACI, M.; TELLES, M. A.; RITACCO, V.; SUFFYS, P. N.;
 LOPES, M. L.; CAMPELO, C. L.; MIRANDA, S. S.; KREMER, K.;
 SILVA, P. E. A.; FONSECA, L. S.; HO, J. L.; KRITSKI, A. L.;
 ROSSETTI, M. L. R. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and
inhA genes and *in vitro* susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*
 clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis
 prevalent countries in South America. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 39,
 2009.

DALCOLMO, M. P.; ANDRADE, M. K. N.; PICON, P. D. Tuberculose
 multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. *Revista de*
Saúde Pública, v. 41, p. 34-42, 2007.

DALE, J. W.; BRITAIN, D.; CATALDI, A. A.; COUSINS, D.;
 CRAWFORD, J. T.; DRISCOLL, J.; HEERSMA, H.; LILLEBAEK, T.;
 QUITUGUA, T.; RASTOGI, N.; SKUCE, R. A.; SOLA, C.; VAN
 SOOLINGEN, D.; VINCENT, V. Spacer oligonucleotide typing of
 bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations
 for standardized nomenclature. **International Journal of Tuberculosis
 and Lung Disease**, v. 5, n. 3, p. 216-219.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v.
 100, p. 1862-1870, 2006

DANTES, R.; METCALFE, J.; KIM, E.; KATO-MAEDA, M.; HOPEWELL, P. C.; KAWAMURA, M.; NAHID, P.; CATTAMANCHI, A. Impacto f Isoniazid Resistance-Conferring Mutations on the Clinical Presentation of Isoniazid Mono-resistant Tuberculosis. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. e37956, 2012.

DAVIS, J. L.; CATTAMANCHI, A.; CUEVAS, L. E.; HOPEWELL, P. C.; STEINGART, K. R. Diagnostic accuracy of same-day microscopy versus standard microscopy for pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, p. 147-154, 2013.

DAVIS, J. M.; RAMAKRISHNAN L. The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. **Cell**, v. 136, p. 37-49, 2008.

DEMAY, C.; LIENS, B.; BURGUIÈRE, T.; HILL, V.; COUVIN, D.; MILLET, J.; MOKROUSOV, I.; SOLA, C.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N. SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 755-766, 2012.

DESSEN, A.; QUÉMARD, A.; BLANCHARD, J. S.; JACOBS Jr., W. R.; SACCHETTINI, J. C. Crystal Structure and Function of the Isoniazid Target of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 267, p. 1638-1641, 1995.

DIVE. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Apresentação Oral Dr. Sérgio Adam Mendonça – Coordenação Estadual de Tuberculose. IV Seminário de Infectologia e I Seminário de Pneumologia do Hospital Nereu Ramos, 2011.

DIVE. Secretaria de Estado da Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Programa Estadual de Controle de Tuberculose, 2010.

DROBNIOWSKI, F.; BALABANOVA, Y.; NIKOLAYEVSKY, V.; RUDDY, M.; KUZNETZOV, S.; ZAKHAROVA, S.; MELENTYEV, A.; FEDORIN, I. Drug-Resistant Tuberculosis, Clinical Virulence, and

the Dominance of the Beijing Strain Family in Russia. **Journal of American Medical Association**, v. 293, n. 22, p. 2726-2731, 2005.

DYE, C.; SCHEELE, S.; DOLIN, P.; PATHANIA, V.; RAVIGLIONE, M. C. Global Burden of Tuberculosis. **Journal of American Medical Association**, v. 282, n. 7, p. 677-686, 1999.

ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, p. 581-591, 2012.

EUZEBY, 2013. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em:
<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>. Acesso em 20/11/2013.

FLOSS, H. G.; YU, T. W. Rifamycin – Mode of action, Resistance, and Biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 621-632, 1005.

FRIEDEN, T. Toman's Tuberculosis – Case detection, treatment, and monitoring = questions and answers, Geneva: World Health Organization, 2004.

GAGNEUX, S.; LONG, C. D.; SMALL, P. M.; VAN, T.; SCHOOLNIK, G. K.; BOHANNAN, B. J. M. The Competitive Cost of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 312, p. 1944-1946, 2006.

GARG, S. K.; TIWARI, R. P.; TIWARI, D.; SINGH, R.; MALHOTRA, D.; RAMNANI, V. K.; PRASAD, G. B. K. S.; CHANDRA, R.; FRAZIANO, M.; COLIZZI, V.; BISEN, P. S. Diagnosis of Tuberculosis: Available Technologies, Limitations, and Possibilities. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 17, p. 155-163, 2003.

GREIF, G.; COITINHO, C.; RIVAS, C.; VAN INGEN, J.; ROBELLO, C. Molecular analysis of isoniazida-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Uruguay. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 16, n. 7, p. 947-949, 2012.

GROENEN, P. M.; BUNSCHOTEN, A. E.; VAN SOOLINGEN, D.; VAN EMBDEN, J. D. A. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain

differentiation by a novel typing method. *Molecular Microbiology*, v. 10, n. 5, p. 1057-1065, 1993.

GUO, H.; SEET, Q.; DENKIN, S.; PARSONS, L., ZHANG, Y. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1527-1531.

GUPTA A.; KAUL, A.; TSOLAKI, A. G.; KISHORE, U.; BHAKTA, S. *Mycobacterium tuberculosis*: Immune evasion, latency and reactivation. **Immunobiology**, v. 217, p. 363-374, 2012.

HAEILI, M.; DARBAN-SAROKHALIL, D.; FOOLADI, A. A.; JAVADPOUR, S.; HASHEMI, A.; SIAVOSHI, F.; FEIZABADI, M. M. Spoligotyping and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from five provinces of Iran. **Microbiology Open**, v. 2, n. 6, p. 988-996, 2013.

HALDAR, S.; BOSE, M. CHAKRABARTI, P.; DAGINAWALA, H. F.; HARINATH, B C. KASHYAP, R. S.; KULKARNI, S.; MAJUMDAR, A.; PRASAD, H. K.; RODRIGUES, C.; SRIVASTAVA, R.; TAORI, G. M.; VARMA-BASIL, M.; TYAGI, J. S. Improved laboratory diagnosis of tuberculosis – The Indian experience. **Tuberculosis**, v. 91, p. 414-426, 2011.

HALDAR, S.; BOSE, M.; CHAKRABARTI, P.; DAGINAWALA, H. F.; HARINATH, B. C.; KASHYAP, S.; KULKARNI, S.; MAJUMDAR, A.; PRASAD, H. K.; RODRIGUES, C.; SRIVASTAVA, R.; TAORI, G. M.; VARMA-BASIL, M.; TYAGI, J. S. Improved laboratory diagnosis of tuberculosis – The Indian experience. **Tuberculosis**, v. 91, p. 414-426, 2011.

HELB, D.; JONES, M.; STORY, E.; BOHEME, C.; WALLACE, E.; HO, H.; KOP, J.; OWENS, M. R.; RODGERS, R.; BANADA, P.; SAFI, H.; BLAKEMORE, R.; LAN, N. T. N.; JONES-LÓPEZ, E. C.; LEVI, M.; WINN-DEEN, E.; CHRISTEL, L.; DAILEY, P.; PERKINS, M. D.; PERSING, D. H.; ALLAND, D. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistance by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 229-237, 2010.

HERRERA, L.; VALVERDE, A.; SAIZ, P.; SÁEZ-NETO, J. A.; PORTERO, J. L.; JIMÉNEZ, M. S. Molecular characterization of isoniazida-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in the Philippines. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 572-576, 2004.

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 and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, 2005.

HOFLING, C. C.; PAVAN, E. M.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; FERRAZOLI, L.; AILY, D. C. G.; ALBUQUERQUE, D. M.; RAMOS, M. C. Prevalence of the *katG* Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 1, p. 87-93, 2005.

HOVE, P.; MOLEPO, J.; DUBE, S.; NCHABELENG, M. Genotypic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Pretoria. **South African Journal of Epidemiology and Infection**, v. 27, n. 2, p. 77-83, 2013.

IMPERIALE, B. R.; ZAMÁRRAGA, M. J.; WELTMAN, G.; ZUDIKER, R.; CATALDI, A. A.; MORCILLO, N. S. First Evaluation in Argentina of the GenoType® MTBDR*plus* assay for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* detection from clinical isolates and specimens. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 44, p. 283-289, 2012.

JACOBSON, K. R.; THERON, D.; KENDALL, E. A.; FRANKE, M. L.; BARNARD, M.; VAN HELDEN, P. D.; VICTOR, T. C.; STREICHER, E. M.; MURRAY, M. B.; WARREN, R. M. Implementation of GenoType MTBDR*plus* Reduces Time to Multidrug-Resistant Tuberculosis Therapy Initiation in South Africa. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 4, p. 503-508, 2013.

JASMER, R. M.; NAHID, P.; HOPEWELL, P. C. Latent Tuberculosis Infection. **The New Journal of Medicine**, v. 347, n. 23, p. 1860-1866.
JNAWALI, H. N.; HWANG, S. C.; PARK, Y. K.; KIM, H.; LEE, Y. S.; CHUNG, G. T.; CHOE, K. H.; RYOO, S. Characterization of mutations

in multi- and extensive drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Republic of Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 2, p. 187-196, 2013.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J. Simultaneous Detection and Stain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 907-914, 1997.

KANDUMA, E.; MCHUGH, T. D.; GILLESPIE, S. H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user's guide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 781-791, 2003.

KAPUR, V. LI, L. L.; IORDANESCU, S.; HAMRICK, M. R.; WANGER, A.; KREISWIRTH, B. N.; MUSSER, J. M. Characterization by Automated DNA Sequencing of Mutations in the Gene (*rpoB*) Encoding the DNA Polymerase β Subunit in Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from New York City and Texas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1095-1098, 1994.

KAUFMANN S. H. E.; SCHAIBLE, U. E. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 469-475, 2005.

KHAN, S. N.; NEIMANN, S.; GULFRAZ, M.; QAYYUM, M.; SIDDIQI, S.; MIRZA, Z. S.; TAHSIN, S.; EBRAHIMI-RAD, M.; KHANUM, A. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* form Patients in Punjab, Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 45, p. 93-100, 2013.
 KOCK, R. The etiology of tuberculosis. **Berliner Klinischen Wochenschrift**, n. 15, p. 221-230, 1882.

KOPPAKA, R.; BOCK, N. How reliable is chest radiography? In: FRIEDEN, T. Toman's Tuberculosis – Case detection, treatment, and monitoring - questions and answers, Geneva: World Health Organization, 2004.

KOUROUT, M.; CHAOU, I.; SABOUNI, O.; LAHLOU, O.; EL MZIBRI, M.; JORDAAN, A.; VICTOR, T. C.; AKRIM, M.; EL

AOUAD, R. Molecular Characterization of rifampicina-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Morocco. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 11, n. 11, p. 1440-1442, 2009.

KOXHAMKULOV, U.; AKHMETOVA, A.; RAKHIMOVA, S.; BELOVA, E.; ALENOVA, A.; BISMILDA, V.; CHINGISSOVA, L.; ISMAILOV, S.; RAMANCULOV, E.; MOMYNALIEV, K. Molecular Characterization of Rifampin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Kazakhstan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, n. 64, p. 253-255, 2011.

KOZLOV, M.; NUDLER, E.; NIKIFOROV, V.; MUSTAEV, A. Reactive Rifampicin Derivate Able to Damage Transcription Complex. **Bioconjugate Chemistry**, v. 24, p. 443-447, 2013.

KUBICA, T.; AGZAMOVA, R.; WRIGHT, A.; AZIZ, M. A.; RAKISHEV, G.; BISMILDA, V.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S.; NIEMANN, S. The Beijing genotype as a major cause of drug-resistant tuberculosis in Kazakhstan. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 6, p. 646-653, 2005.

KWAN, C. K.; ERNST J. D. HIV and Tuberculosis: a Deadly Human Syndemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 351-376, 2011.

LAVENDER, C.; GLOBAN, M.; SIEVERS, A.; BILLMAN-JACOB, H.; FYFE, J. Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Collected in Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4068-4074, 2005.

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

LEE, A. S. G.; LIM, I. H. K.; TANG, L. L. H.; TELENTI, A.; WONG, S. Y. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 2087-2089, 1999.

LEE, A. S. G.; LIM, I. H. K.; TANG, L. L. H.; WONG, S. Y. High Frequency of Mutations in the *rpoB* Gene in Rifampin-Resistant

Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Singapore. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 2026-2027.

LIPIN, M. Y.; STEPANSHINA, V. N.; SHEMYAKIN, I. G.; SHINNICK, T. M. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 620-626, 2007.

LIRA, L. A. S.; SANTOS, F. C. F.; CARVALHO, M. S. Z.; MONTENEGRO, R. A.; LIMA, J. F. C.; SCHINDLER, H. C.; MONTENEGRO, L. M. L. Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples of patients with pulmonary TB. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 1103-1108, 2012.

MACHADO, D.; PERDIGÃO, J.; RAMOS, J.; COUTO, I.; PORTUGAL S.; RITTER, C.; BOTTGER, E. C.; VIVEIROS, M. High-level to isoniazida and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with *inhA* double mutations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 1728-1732, 2013.

MADANIA, A.; HABOUS, M.; ZARZOUR, H.; GHOURY, I.; HEBBO, B. Characterization of Mutations Causing Rifampicin and Isoniazid Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Syria. **Polish Journal of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 23-32, 2012.

MAKROUSOV, 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 Northeastern Russia, 1996 to 2001. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1417-1424, 2002.

MARDASSI, H.; NAMOUCHI, A.; HALTITI, R.; ZARROUK, M.; MHENNI, B.; KARBOUL, A.; KHABOUCHE, N.; VAN PITTIUS, N. C. G.; STREICHER, E. M.; RAUZIER, J.; GICQUEL, B.; DELLAGI, K. Tuberculosis due to Resistant Haarlem Strain, Tunisia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 957-961, 2005.

MARIAM, D. H.; MENGISTU, Y.; HOFFNER, S. E.; ANDERSSON, D. I. Effect of *rpoB* Mutations Conferring Rifampin Resistance on Fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1289-1294, 2004.

MDLULI, K.; SLAYDEN, R. A.; ZHU, Y.; RAMASWAMY, S.; PAN, X.; MEAD, D.; CRANE, D. D.; MUSSER, J. M.; BARRY, C. E. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl ACP Synthase by Isoniazid. **Science**, v. 280, p. 1607-1610, 1998.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Various Combinations of Isoniazid with Streptomycin or with P.A.S. in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. **British Medical Journal**, v. 19 fev. , p. 435-445, 1955.

MEHTA, P. K.; RAJ, A. SINGH, N. KHULLER, G. K. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, p. 20-36, 2012.

MIDDLEBROOK, G.; COHN, M. L. Some Observations of the Pathogenicity of Isoniazid-Resistant Variants of Tubercle Bacilli. **Science**, v. 118, p. 297-299, 1953.

MIESEL, L.; WEISBROD, T. R.; MARCINKEVICIENE, J. A.; BITTMAN, R.; JACOBS Jr, W. R. NADH Dehydrogenase Defects Confer Isoniazid Resistance and Conditional Lethality in *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 9, p. 2459-2467, 1998.

MINH, N. N.; BAC, N. V.; SON, N. T.; LIEN, V. T. K.; HA, C. H.; CUONG, N. H.; MAI, C. T. N.; LE, T. H. Molecular Characteristics of Rifampin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 598-601, 2012.

MOADDAB, S. R.; FARAJNIA, S.; KARDAN, D.; ZAMANLOU, S.; ALIKHANI, M. Y. Isoniazid MIC and *katG* Gene Mutations among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Northwest of Iran. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 14, n. 6, p. 540-545, 2011.

MOHAN, V. P.; SCANGA, C. A.; YU, K.; SCOTT, H. M.; TANAKA, K. E.; TSANG, E.; TSAI, M. C.; FLYNN, J. L.; CHAN, J. Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Host Immune Response in Chronic Persistet Tuberculosis: Possible Role For Limiting Pathology. **Infection and Immunity**, v. 69, n.3, p. 1847-1855, 2001.

MONTORO E.; RODRIGUEZ, R. Chapter 7: Global Burden of Tuberculosis. In: PALOMINO, Juan Carlos; LEÃO, Sylvia Cardoso; RITACCO, Viviana (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Antuérpia, São Paulo, Buenos Aires, 2007.

MORLOCK, G. P.; METCHOCK, B.; SIKES, D.; CRAWFORD, J. T.; COOKSEY, R. C. *ethA*, *inhA*, and *katG* Loci of Ethionamide-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3799-3805, 2003.

MORRISON, J.; PAI, M.; HOPEWELL, P. C. Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 359-368, 2008.

N'GUESSAN, K. R.; DOSSO, M.; EKAZA, E.; KOUAKOU, J. JARLIER, V. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from new cases in Lagunes region (Côte d'Ivoire). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 484-504, 2008.

NAHID, P. KIM, P. S.; EVANS, C. A.; ALLAND, D.; BARER, M.; DIEFENBACH, J.; ELLNER, J.; HAFNER, R.; HAMILTON, C. D.; IADEMARCO, M. F.; IRETON, G.; KIMERLING, M. E; LEINHARDT, C.; MACKENZIE, W. R.; MURRAY, M.; PERKINS, M. D.; POSEY, J. E.; ROBERTS, T.; SIZEMORE, C.; STEVENS, W. S.; VIA, L.; WILLIAMS, S. D.; YEW, W. W. SWINDELLS, S. Clinical Research and Development of Tuberculosis Diagnostics: Moving From Silos to Synergy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, p. S159-S168, 2012.

NARASIMHAN, P.; WOOD, J.; MACINTYRE, C. R.; MATHAI, D. Risk Factors for Tuberculosis. **Pulmonary Medicine**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

NIETO, L. M.; FERRO, B. E.; VILLEGAS, S. L.; MEHAFFY, C.; FORERO, L.; MOREIRA, C.; RASTOGI, N.; VAN SOOLINGEN, D. Characterization of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis Cases from Valle del Cauca, Colombia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4185-4187, 2012.

NORTON D. P.; HOLLAND, B. L. Current management options for latent tuberculosis: a review. **Infection and Drug Resistance**, v. 5, p. 163-173, 2012.

PAI, M.; RILEY, L. W.; COLFORD Jr, J. M. Interferon- γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, p. 761-776, 2004.

PALMERO, Domingo J. Chapter 17: Tuberculosis and HIV/AIDS. In: PALOMINO, Juan Carlos; LEÃO, Sylvia Cardoso; RITACCO, Viviana (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Antuérpia, São Paulo, Buenos Aires, 2007.

PALUCH-OLEŚ, J.; KOZIOL-MONTEWKA, M.; MAGRYS, A. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Eastern Poland. **New Microbiologica**, v. 32, p. 147-152, 2009.

PANTANO, S.; ALBER, F.; LAMBA, D.; CARLONI, P. NADH Interactions With WT- and S94A-Acyl Carrier Protein Reductase From *Mycobacterium tuberculosis*: An Ab Initio Study. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 47, p. 62-68, 2002.

PAYTON, M.; AUTY, R.; DELGODA, R.; EVERETT, M.; SIM, E. Cloning and Characterization of Arylamine *N*-Acetyltransferase Genes from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: Increased Expression Results in Isoniazid Resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1343-1347, 1999.

PERIZZOLO, P. F.; COSTA, E. R. D.; RIBEIRO, A. W.; SPIES, F. S.; RIBEIRO, M. O. DIAS, C. F.; UNIS, G.; SILVA, P. A.; GOMES, H. M.; SUFFYS, P. N. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. **Tuberculosis**, v. 92, p. 56-59, 2012.

PINTO, L. M.; PAI, M.; DHEDA, K.; SCHWARTMAN, K.; MENZIES, D.; STEINGART, K. R. Scoring systems using chest radiographic features for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in adults: A systematic review. **European Respiratory Journal**, v. 42, n. 2, p. 480-494, 2013.

POUDEL, A.; NAKAJIMA, C.; FUKUSHIMA, Y.; SUZUKI, H.; PANDEY, B. D.; MAHARJAN, B.; SUZUKI, Y. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolated in Nepal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 6, p. 2831-2836, 2012.

PRAMMANANAN, T.; CHEUNOY, W.; TAECHAMAHAPUN, D.; YORSANGSUKKAMOL, J. PHUMPRUCH, S.; PHDARAT, P.; LEECHAWENGWONG, M.; CHAIPRASERT, A. Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) strains from Thailand and development of a rapid method for mutation detection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 446-453, 2008.

Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Programa Nacional de Controle da Tuberculose, 2010.

PYM, A. S.; SAINT-JOANIS, B.; COLE S. T. Effect of *katG* Mutations on the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the Implication for Transmission in Humans. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 4955-2960, 2002

RAHIM, Z. NAKAJIMA, C.; RAQIB, R.; ZAMAN, K.; ENDTZ, H. P.; VAN DER ZANDEN, A. G. M.; SUZUKI, Y. Molecular mechanism of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from Bangladesh. **Tuberculosis**, v. 92, p. 529-534, 2012.

RAMOS, R. M.; PEREZ, J. M.; BAPTISTA, L. A.; AMORIM, H. L. N. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-*N*-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* with isoniazid: a computational study on a new possible mechanism of resistance. **Journal of Molecular Modeling**, DOI 10.1007/s00894-012-1383-6, 2012

RASTOGI, Nalin. **Spoligotyping family doubt (SIT106)**. [mensagem pessoal] Mensagem recebida por: <rodrigo.prim@posgrad.ufsc.br>. em: 06 ago. 2013.

RAVIGLIONE, M. C. & SMITH, I. M. XDR Tuberculosis - Implications for Global Public Health. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 7, p. 656-659, 2007.

RICCARDI, G.; PASCA, M. R.; BURONI, S. Mycobacterium tuberculosis: drug resistance and future perspectives. **Future Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 597-614, 2009.

RICHARDSON, E. T.; SAMSON, D.; BANAEI, N. Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1497-1502.

RIEDER, H.L.; VAN DEUN, A.; KAM, K.M.; KIM, S.J.; CHOND, T.M, TRÉBUCQ, A. and URBANCZIK, R. **Priorities for Tuberculosis Bacteriology Services in Low-Income Countries**. 2 ed. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union), 2007.

RISKA, P. F.; JACOBS, W. R.; ALLAND, D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, p. 54-60, 2000.

RODRIGUES, V. F. S.; Telles, M. A.; RIBEIRO, M. O.; ROSSETTI, M. L. R.; ZAHA, A.; CAFRUNE, P. I. Characterization of *pncA* Mutations of Pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 444-446, 2005.

ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, vol. 36, n 4, p. 525-532, 2002.

ROZO-ANAYA, J. C.; RIBON, W. Molecular tools for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. **Revista de Salud Pública**, v. 12, n. 3, p. 510-521, 2010.

SAM, I.; DROBNIIEWSKI, F.; MORE, P.; KEMP, M.; BROWN, T. *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistance, United Kingdom. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, p. 752-759, 2006.

SANDGREN, A.; STRONG, M.; MUTHUKRISHNAN, P.; WEINER, B. K.; CHURCH, G. M.; MURRAY, M. B. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. **Plos Medicine**, v. 6, n. 2, p. e1000002, 2009.

SANDY, J.; MUSHTAQ, A.; KAWAMURA, A.; SINCLAIR, J.; SIM, E.; NOBLE, M. The Structure of Arylamine *N*-acetyltransferase from *Mycobacterium smegmatis* – An Enzyme which Inactivates the Anti-tubercular Drug, Isoniazid. **Journal of Molecular Biology**, v. 318, p. 1071-1083, 2002.

SANTOS, L. C.; BOUSQUET, H. M.; PEREIRA, A. M.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. A high prevalence of resistance in new tuberculosis cases of midwestern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 1052-1057, 2010.

SCHLUGER, N. W. The Pathogenesis of Tuberculosis: The First One Hundred (and Twenty-Three) Years. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 32, p. 251-256, 2005.

SCHROEDER, E. K.; SOUZA, O. N.; SANTOS, D. S.; BLANCHARD, J. S.; BASSO, L. A. Drugs that Inhibit Mycolic Acid Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 3, p. 197-225, 2002.

SEKIGUCHI, J.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; AUGUSTYNOWICZ-KOPEC, E.; ZWOLSKA, Z.; KIRIKAE, F.; TOYOTA, E.; KOBAYASHI, I.; MORITA, K.; KUDO, K.; KATO, S.; KURATSUJI, T.; MORI, T.; KIRIKAE, T. Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 179–192, 2007.

SENNA, S. G.; GOMES, H. M.; RIBEIRO, M. O.; KRITSKI, A. L.; ROSSETTI, M. L. R.; SUFFYS, P. N. In house reverse line hybridization assay for rapid detection of susceptibility to rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 385-389, 2006.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A. Multidrug-resistant tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, p. 354-376, 2004.

SHERMAN, D. R.; MDLULI, K.; HICKEY, M. J.; ARAIN, T. M. MORRIS, S. L.; BARRY III, C. E.; STOVER, C. K. Compensatory *ahpC* Gene Expression in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 272, p. 1641-1643, 1996.

SILVA, M. S. N.; SENNA, S. G.; RIBEIRO, M. O.; VALIM, A. M.; TELLES, M. A.; KRITSKI, A. L.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M. L. R. Mutations in *katG*, *inhA* and *ahpC* genes of Brazilian Isoniazid-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4471-74, 2003.

SILVA, P. A.; AINSA, J. A. Chapter 18: Drugs and Drug Interactions. In: PALOMINO, Juan Carlos; LEÃO, Sylvia Cardoso; RITACCO, Viviana (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Antuérpia, São Paulo, Buenos Aires, 2007.

SIQUEIRA, H. R.; FREITAS, F. A. D.; OLIVEIRA, D. N.; BARRETO, A. M. W.; DALCOLMO, M. P.; ALBANO, R. M. Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two diferente regions of the *katG* gene. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 8, p. 773-779, 2009.

SLOTAR, D.; ESCALANTE, P.; JONES, B. E. Pulmonary manifestations of HIV/AIDS in the tropics. **Clinical Chest Medicine**, v. 23, n. 2, p. 355-67, 2002.

SOINI, H.; MUSSER, J. M. Molecular diagnostic of mycobacteria. **Clinical Chemistry**, v. 47, p. 809-814, 2001.

SOLA, C.; FERDINAND, S.; MAMMINA, C.; NASTASI, A.; RASTOGI, N. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily Based on Spoligotyping and Variable Number of Tandem DNA Repeats and Comparison with a Spoligotyping Database for Population-Based Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1559-1565, 2001.

SPINDOLA de MIRANDA, S.; KRITSKI, A. L.; FILLIOL, I.; MABILAT, C.; PANTEIX, G.; DROUET, E. Mutations in the *rpoB* Gene of Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Brazil and France. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 2, p. 247-250, 2001.

STRAVUM, R.; MYNEEDU, V. P.; ARORA, V. K.; AHMED, N.; GREWAL, H. M. S. In-Depth Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* from New Delhi – Predominance of Drug Resistant Isolates of the ‘Modern’ (TbD1^r) Type. **Plos One**, v. 4, n. 2, p. e4540.

SUN, Y. J.; LEE, A. S. G.; WONG, S. Y.; PATON, N. I. Analysis of the role of *Mycobacterium tuberculosis kasA* gene mutations in isoniazid resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 833-835, 2007.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

TAKAYAMA, K. & KILBURN, J. O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 33, p.1493–1499, 1989.
TAKIFF, H. E. The molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: BASTIAN, I; PORTAELS, F. (ed). **Multidrug-resistant tuberculosis**. Netherlands: Klawer Academic Publishers, 2000.

TANG, C.; REYES, J. F.; LUCIANI, F.; FRANCIS, A. R.; TANAKA, M. M. spoTools: online utilities for analyzing spoligotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Bioinformatics**, v. 24, n. 20, p. 2414-2415, 2008.

TANG, K.; SUN, H.; ZHAO, Y.; GUO, J.; ZHANG, C.; FENG, Q.; HE, Y.; LUO, M.; LI, Y., SUN, Q. Characterization of rifampin-resistant

isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Sichuan in China. **Tuberculosis**, v. 93, p. 89-95, 2013.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 3, p. 323-334.

TELENTI, A.; IMBODEN P.; MARCHESI, P.; COLE, S.; COLSTON, M.; MATTER, L.; SCHOPFER, K.; BODMER, T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **The Lancet**, v. 341, p. 647-650, 1993.

TESSEMA B.; BEER, J.; MERKER, M.; EMMRICH, F.; SACK, U.; RODLOFF, A. C. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Noerthwest Ethiopia. **BCM Infectious Diseases**, v. 13, n. 131, p. 1-11, 2013.

TESSEMA, B.; BEER, J.; EMMRICH, F.; SACK, U.; RODLOFF, A. C. Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 37, 2012.

THIERRY, D.; BRISSON-NÖEL, A.; VINCENT-LÉVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J. L.; GICQUEL, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Insertion Sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2668-2673, 1990.

TORRES, M. J.; CRIADO, A.; GÓNZALEZ, N.; PALOMARES, J. C.; AZNAR, J. Rifampin and isoniazida resistance associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Seville, Spain. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 6, n. 2, p. 160-163, 2002.

UNISSA, A. N.; SELVAKUMAR, N.; NARAYANAN, S.; NARAYANAN, P. R. Moecular analysis of isoniazida-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 31, p. 71-75, 2008.

United Nations Programme on HIV/AIDS - Word Health Organization. AIDS epidemic update: December 2007, Geneva: UNAIDS/WHO, 2007.

VAN EMBDEN, J. D. A.; CAVE, M D.; CRAWFORD, J. T.; DALE, J. W.; EISENACH, K. D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; MCADAM, R.; SHINNICK, T. M.; SMALL, P. M. Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HASS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; van EMBDEN, J. D. A. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in Enzymology**, v; 235, p. 196-204, 1994.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HASS, P.E.; VAN DOORN, H.R.; KUIJPER, E.; RINDER, H.; BORGDORFF, M. W. Mutations at amino acid position 315 of the katG gene are associated with high level resistance to isoniazid other drug in the Netherlands. **Journal of Infectious Disease**, n. 182, p. 1788-1790, 2000.

VARELA, G.; GONZÁLEZ, S.; GADEA, P.; COITINHO, C.; MOTA, I.; GONZÁLEZ, G.; GOÑI, F.; RIVAS, C.; SCHELOTTO, F. Prevalence and dissemination of the Ser315Thr substitution within the KatG enzyme in isoniazida-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Uruguay. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1518-1522, 2008.

VARGHESE, B.; HILLEMANN, A.; WIJAYANTI, D. R.; SHOUKRI, M.; AL-RABIAHN, F.; AL-OMARI, R.; AL-HAJOOJ, S. New Insight into the molecular characterization of isoniazid and rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Saudi Arabia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 549-556, 2012.

VIEDMA, D. G.; MOKROUSOV, I.; RASTOGI, N. Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 1, p. 8-13, 2011.

VILCHEZE, C.; JACOBS Jr., W. R. The Mechanism of Isoniazid Killing> Clarity Through the Scope of Genetics. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 61, p. 35-50, 2007.

WANG, Y. C.; ZHU, R. Y.; XU, Y. Y.; ZHAO, M. Q.; LIU, Y. H.; LI, B.; CHEN, J. D. Molecular characterization of Drug-Resistant

Mycobacterium tuberculosis Isolates in Guangdong, China. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 62, p. 270-274, 2009.

WHITWORTH, H. S.; SCOTT, M.; CONNELL, D. W.; DONGÉS, B.; LALVANI, A. IGRAs – The gateway to T cell based TB diagnosis. **Methods**, v. 61, p. 52-62, 2013.

WILSON, T. M.; COLLINS, D. M. *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 1025-1034, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Handbook of Resolutions and Decisions, vol. 3. Geneva: World Health Organization, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Framework for Effective Tuberculosis Control. WHO Tuberculosis Programme. Geneva: World Health Organization, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis & Sustainable Development. Geneva: World Health Organization, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global DOTS Expansion Plan. Progress in TB Control in high-burden countries. Geneva: World Health Association, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. An Expanded DOTS Framework for Effective Tuberculosis Control. Geneva: World Health Organization, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Standards for Tuberculosis Care. The Hague: Tuberculosis Coalition for Technical Assistance, 2006a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Stop TB Strategy – Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millenium Development Goals. Geneva: World Health Organization, 2006b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global MDR-TB & XDR-TB Response Plan 2007-2008. Geneva: World Health Organization, 2007a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Use of Liquid TB Culture and Drug Susceptibility Testing (DST) in Low and Medium Income Settings. Geneva: World Health Organization, 2007b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for programmatic management of drug-resistant tuberculosis – Emergency update. Geneva: World Health Organization, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global Plan to stop TB 2011-2015. Geneva: World Health Organization, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report 2012. Geneva: World Health Organization, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report 2013. Disponível em : <
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf?ua=1>. Acesso em 09 de dez. de 2013.

WU, X.; LU, Y.; ZHANG, J.; LIANG, J.; LI, H.; ZHANG, G.; LÜ, C.; DING, B. Detection of the mutations in *katG315* and *inhA-15* of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Chinese patients. **Chinese Medical Journal**, v. 119, n. 3, p. 230-233, 2006.

YOON, J. H.; NAM, J. S.; KIM, K. J.; CHOI, Y.; LEE, H.; CHO, S. N.; RO, Y. T. Molecular characterization of drug-resistant and –suceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with tuberculosis in Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 72, p. 52-61, 2012.

YOUNG D. B.; PERKINS, M. D.; DUNCAN, K.; BARRY III, C. E. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 1255-1265, 2008.

YUAN, X.; ZHANG, T.; KAWAKAMI, K.; ZHU, J.; LI, H.; LEI, J. TU, S. Molecular Characterization of Multidrug- and Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Jiangxi, China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2404-2413, 2012.

ZETTERSTROM, R. Selman A. Waksman (1888-1973) Nobel Prize in 1952 for the Discovery of streptomycin, the first antibiotic effective against tuberculosis. **Acta Paediatrica**, v. 96, p. 317-319, 2007.

ZHANG, Y. & TELENTI, A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, In: HARFUL, G. F.; JACOBS Jr, W. R. (ed). **Molecular Genetics of Mycobacteria**. Washington: ASM Press, 2000.

ZHANG, Y.; DHANDAYUTHAPANI, S.; DERETIC, V. Molecular basis for the exquisite sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 13212-13216, 1996.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; YOUNG, D.; COLE, S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v. 358, p. 591-593, 1992.

ZHANG, Y.; YEW, W. W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 13, n. 11, p. 1320-1330, 2009.

ZHOU, A.; NAWAZ, M.; DUAN, Y.; MOORE, J. E.; MILLAR, B. C.; XU, J.; YAO, Y. Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Xi'an, China. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 2, p. 275-281, 2011.

ANEXOS

ANEXO A. Parecer consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes aos fármacos (TB-MDR) de amostras clínicas do estado de Santa Catarina

Pesquisador: Maria Luiza Bazzo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01738512.1.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 204.297

Data da Relatoria: 18/02/2013

Apresentação do Projeto:

Dissertação de mestrado, com financiamento do CNPq, o projeto propõe investigar o perfil da resistência aos múltiplos fármacos de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes do Laboratório Central do Estado de Santa Catarina no período de janeiro de 2010 ao mês de janeiro de 2013. As análises moleculares serão realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias da Universidade Federal de Santa Catarina. Serão incluídos no estudo 200 isolados de *M. tuberculosis* do banco de cepas do LACEN/SC do período de 2010/2013, sendo 100 cepas sensíveis aos fármacos utilizadas como controles e 100 MDR-TB, além da cepa selvagem de referência *M. tuberculosis* H37Rv.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral do projeto é estudar o perfil molecular das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e resistentes aos fármacos no estado de Santa Catarina. Objetivo Secundário: 1. Caracterização das cepas de *M. tuberculosis* isoladas do Laboratório Central do Estado de Santa Catarina pelo método Spoligotyping; 2. Análise do dendograma das famílias pelo programa SpolDB3.0 para comparação dos perfis com as 36 subfamílias identificadas no mundo; 3. Sequenciamento dos principais genes envolvidos na resistência do *M. tuberculosis* aos fármacos das cepas previamente identificadas pelos métodos fenotípicos; 4. Análise dos fatores de risco para transmissão recente de TB nas diferentes regiões do estado de Santa Catarina; 5. Correlação

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

Bairro: Trindade CEP: 88.040-900

UF: SC Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-9206

Fax: (48)3721-9696

E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

das famílias obtidas no Spoligotyping com os dados de resistência aos antimicrobianos e dados epidemiológicos dos pacientes; 6. Elaboração dos manuscritos através dos resultados obtidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informam que não há outros riscos envolvidos, uma vez que não haverá sujeitos de pesquisa porque irão trabalhar com bactérias (isolados de *M. tuberculosis* de amostras clínicas) do banco de cepas do LBMM. Este banco foi construído a partir das amostras cultivadas pelo projeto aprovado no CEPUFSC com o nº168/07. Benefícios: O estudo das características moleculares (sequenciamento dos genes de resistência) das cepas de micobactérias causadoras de tuberculose em Santa Catarina possibilitará a melhor compreensão do perfil circulante e o diagnóstico rápido da resistência ou da multiresistência aos tuberculostáticos possibilitará intervenção imediata, especialmente entre os pacientes imunossuprimidos (co -infectados pelo HIV) evitando desta forma a transmissão primária de cepas resistentes ou multiresistentes, considerado um flagelo mundial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto vem assinada pela pesquisadora responsável e pelo coordenador do programa de pósgraduação em farmácia da UFSC. Os pesquisadores apresentam declaração do LACEN-SC, ligado ao governo do estado, na qual o representante legal declara tomar conhecimento da pesquisa e que cumprirá as determinações da resolução 196/96 e suas complementares. Não é apresentado um TCLE, uma vez que trata-se de pesquisa em banco de cepas, cuja constituição já foi avaliada e aprovada por este comitê. Os pesquisadores informam que não há a possibilidade de rastrear a identidade dos doadores das cepas.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



FLORIANOPOLIS, 25 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br