

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Validação e performance de novos métodos moleculares no diagnóstico da
Tuberculose Resistente

Tese de Doutorado

Raquel de Abreu Maschmann

Porto Alegre

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Validação e performance de novos métodos moleculares no diagnóstico da
Tuberculose Resistente.

Raquel de Abreu Maschmann

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

Co-orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, junho de 2013.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

As coletas das amostras para a realização deste trabalho foram realizadas no Hospital Sanatório Partenon. Este trabalho foi realizado na Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) e na Seção de micobactérias do Laboratório Central do Rio Grande do Sul, Brazil (IPB/LACEN-RS).

Este trabalho teve o financiamento do edita INCT e também apoio financeiro na forma de bolsa do CNPq.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer a minha orientadora Maria Lucia Rossetti pelo apoio e incentivo, ao meu co-orientador Arnado Zaha pela orientação, pelo exemplo a ser seguido e por estar sempre pronto a ajudar.

Gostaria de agradecer ao pessoal do laboratório de micobactérias, Marta Osório Ribeiro, Jocelli Carolo, Simone de David, Thaís Raquel Marcon Machado, Dona Jeci, pela amizade e ajuda no cultivo e na realização dos testes de sensibilidade.

Às amigas, Patricia Cafrune, Luciana Nunes, Fernanda Spies, Andrezza Ribeiro e Mirela Verza que fiz no mestrado e que e agora, mesmo não convivendo no laboratório, permanecem me incentivando.

Ao meus amigos do grupo do HIV, Dennis Junqueira, Rubia Medeiros, Maria Cristina Matte que admiro muito, pela amizade, pelo apoio, pelos cafés na copa, por me ouvir e pela grande ajuda nas análises estatísticas.

Aos amigas do CDCT, Karen Schmid, Mariana Milano, Tatiane Coelho, Regina Bones Barcellos pelo apoio, pelas muitas jantinhas, pelas risadas.

À amiga de faculdade Cássia Maria Cardoso que reencontrei nesse caminho devido ao gosto pelas micobactérias e às amigas Bárbara Netto e Flávia Brust que ela me apresentou e que hoje são minhas queridas amigas também.

Às minhas queridas amigas de colégio, que sempre me apoiaram e incentivaram, por me deixarem mais leve nos nossos encontros semanais e que algumas, mesmo longe, estão sempre em contato com uma palavra de carinho.

Ao meu namorado pelo carinho e incentivo, principalmente nos meses difíceis do final do doutorado.

Aos meus pais e meu irmão querido que são os alicerces da minha vida, por todo amor, pelas palavras de apoio, incentivo e por entender a minha ausência.

A todos que de alguma forma fizeram parte da minha vida, pois sempre deixamos algo de nós nas pessoas, e, ao mesmo tempo, levamos algo delas.

MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas	7
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	10
CAPÍTULO I.....	13
Introdução.....	13
1.1 Tuberculose e epidemiologia.....	13
1.2 Agente etiológico e características da infecção.....	17
1.3 Tratamento.....	19
1.4 Resistência aos fármacos.....	21
1.5 Mecanismo de ação e resistência aos principais fármacos anti-TB.....	22
1.5.1 Isoniazida.....	22
1.5.2 Rifampicina.....	23
1.5.3 Estreptomicina.....	23
1.5.4 Pirazinamida.....	24
1.5.5 Etambutol.....	25
1.5.6 Kanamicina e Capreomicina.....	25
1.5.7 Ofloxacina	26
1.6 Métodos para a detecção de resistência.....	27
1.6.1 Metodologias fenotípicas.....	27
1.6.2 Metodologias genotípicas	28
1.7 Epidemiologia Molecular.....	31
CAPÍTULO II.....	33
2.1 Justificativa.....	33
2.2 Objetivos.....	35
2.3 Organograma do estudo.....	36
CAPÍTULO III.....	37

“Clinical data and molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients at higher risk of having MDR-TB.”

CAPÍTULO IV55

“Performance of the GenoType MTBDRplus Assay Directly on Sputum Specimens from Brazilian Patients with Tuberculosis Treatment Failure or Relapse”

CAPÍTULO V59

“Microplate hybridization assay for detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.”

CAPÍTULO V

6.1 Discussão Geral e Perspectivas75

Bibliografia (CAPÍTULO I)85

Anexos.....95

Lista de Abreviaturas

AMK	Amikacina
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BK	Bacilo de Koch
CAP	Capreomicina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DR	Repetição direta
EMB	Etambutol
ETH	Etionamida
FQ	Fluoroquinolonas
GD	Gerência distrital
HIV/AIDS	Vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência adquirida
INH	Isoniazida
IS	Sequência de inserção
KAN	Kanamicina
LAM	<i>Latin America Mediterranean</i>
MDR	Multidroga resistente
MGIT	<i>Mycobacterial growth indicator tube</i>
MIC	Concentração mínima inibitória
MIRU-VNTR	Unidade de repetição de micobactéria- repetição em tandem de número variável
mRNA	RNA mensageiro
OFL	Ofloxacina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido para-amino salicílico
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PZA	Pirazinamida

QRDR	Regiões que determinam a resistência às quinolonas
RFLP	Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição
RIF	Rifampicina
rRNA	RNA ribossômico
RNA	Ácido ribonucléico
SM	Estreptomicina
SVS	Secretaria de vigilância em saúde
TB-MDR	Tuberculose multi droga resistente
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente

Lista de Figuras

Página

Introdução

Figura 1: Representação gráfica da distribuição de casos de tuberculose no Rio Grande do Sul em 2010.....16

Figura 2: Taxa de incidência de tuberculose por municípios prioritários, no Rio Grande do Sul, 2011 (por 100.000 hab).....16

Figura 3: Mapas da distribuição de TB e AIDS nas Gerências Distritais de Porto Alegre. GD1: Centro; GD2: Noroeste/Humaitá-Navegantes-Ilhas; GD3: Norte/Eixo Baltazar; GD4: Leste-Nordeste; GD5: Glória-Cruzeiro-Cristal; GD6: Sul-Centro Sul; GD7: Partenon-Lomba do Pinheiro; GD8: Restinga-Extremo Sul.....17

Lista de Tabelas

Página

Capítulo I

Introdução

Tabela 1: Casos e Percentual de cultura de escarro no retratamento (recidiva e reingresso pósabandono) de casos pulmonares e pulmonares+extrapulmonares com baciloscopia positiva.....15

Tabela 2. Esquemas de tratamento da TB utilizados no Brasil de 1979 a 2009.....20

Tabela 3. Esquemas terapêuticos básicos utilizados no Brasil a partir de 2010.....20

Tabela 4: Mecanismos de resistência às drogas em *M. tuberculosis*.....26

Capítulo III

Table 1: Comparison between the means of the groups.....44

Table 2: Distribution of host characteristics between the cases drug susceptible, resistant and MDR.....45

Table 3: Frequency and classification of each shared international type (SIT) subfamily, and spoligotyping pattern (n = 58).....47

Table 4: Comparison between resistance patterns and spoligotyping superfamilies.....47

Capítulo IV

Table 1: Strains that have no interpretable patterns in GenoType TBMDRplus assay (n = 6).....56

Table 2: Patterns of results of GenoType MTBDRplus in comparison to DST and sequencing (n = 62)57

Table 3: Diagnostic performance of GenoType MTBDRplus in comparison to DST and sequencing.....58

Capítulo V

Table 1: Probe set for identification of the wild type (WT) and mutant genotypes used to prepare the Detect-TBMDR assay.65

Table 2: Correlation between Detect-TBMDR in comparison to DST, sequencing and GenoType® MTBDRplus.....68

Table 3: Diagnostic performance of Detect-TBMDR in comparison to DST, sequencing and GenoType® MTBDRplus.69

Validação e performance de novos métodos moleculares no diagnóstico de Tuberculose Resistente¹

Autor: Raquel de Abreu Maschmann
Orientador: Maria Lucia Rosa Rossetti

Resumo

Em todo o mundo, menos de 5% dos doentes com tuberculose (TB), sejam casos novos ou previamente tratados, tem a avaliação dos isolados quanto ao perfil de sensibilidade aos antibióticos. No Rio Grande do Sul, estado localizado no sul do Brasil, cerca de 4700 casos novos de TB são registrados a cada ano, com uma taxa de cura de 68,9%, e uma taxa de abandono de 7,5%. A identificação rápida da resistência às drogas, em isolados clínicos de *M. tuberculosis* é importante para o estabelecimento de uma quimioterapia eficaz bem como para evitar a propagação de cepas resistentes. Os objetivos deste estudo foram caracterizar os pacientes de TB com maior risco de possuir TB-MDR, analisando o perfil de resistência às drogas dos isolados e o perfil epidemiológico desses pacientes. Além disso utilizou-se as amostras clínicas para avaliar o teste comercial (GenoType® MTBDR_{plus}) e para desenvolver e padronizar um novo teste (Detect-TBMR) para detectar as mutações mais frequentes associadas a resistência à INH e RIF. Uma proporção significativamente maior (75% versus 20%, p = 0,009) de pacientes do gênero masculino foi encontrada entre os casos resistentes às drogas do que entre os casos suscetíveis. 43,8% dos pacientes demoraram mais de 30 dias para procurar assistência médica e no grupo TB MDR, 25% dos casos não tinha sido submetido a qualquer tratamento prévio anti-TB. Em nossas amostras, encontramos uma proporção de 48,3% de TB-MDR. A família T foi a família de spoligotipo mais frequente. Comparado com o método da proporções, a sensibilidade e especificidade do ensaio MTBDR_{plus} foram 82% e 94% para a resistência à RIF, 60% e 94% para resistência à INH. Comparado com sequenciamento, a sensibilidade e especificidade do ensaio MTBDR_{plus} foi 92% e 97% para a resistência à RIF e 100% e 100% para a resistência à INH, respectivamente. Para detectar resistência à RIF e INH, o ensaio Detect-TBMDR mostrou sensibilidade e especificidade de 79,3% e 77,0% e 100% e 65%, respectivamente, em comparação com o método da proporções. Comparado com o sequenciamento, a sensibilidade e especificidade do ensaio Detect-TBMDR foi de 81,2% e 94,7% e 100% e 96,2%, para detectar e resistência à RIF e INH, respectivamente. Ainda existem discordâncias entre o método das proporções e a abordagem molecular, particularmente em relação a resistência à INH. Contudo, estes métodos são muito importantes para o manejo mais rápido e correto dos pacientes, auxiliando na escolha do melhor esquema terapêutico.

¹Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (110p) Julho, 2013.

Validation and performance of new molecular methods for the diagnosis of resistant tuberculosis¹

Author: Raquel de Abreu Maschmann

Adviser: Maria Lucia Rosa Rossetti

Abstract

In most parts of the world, less than 5% of new and previously treated tuberculosis (TB) patients are tested for multidrug resistance (MDR) TB. In Rio Grande do Sul state, the southern most Brazilian state; approximately 4700 new cases of TB are recorded each year, with a cure rate of 68.9%, and a noncompliance rate of 7.5%. Rapid identification of drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* is important to facilitate rapid and adequate chemotherapy of TB, and to prevent the spread of resistant strains. The aim of this study was to characterize TB patients at higher risk of having MDR-TB, to analyze the drug resistance and epidemiological profile of these patients. Use the clinical samples to assess the commercial test (GenoType® MTBDRplus) and develop and standardize a new test (Detect-MDR-TB) for detecting the most frequent mutations associated with resistance to INH and RIF. A significantly higher proportion (75% versus 20%, $p = 0.009$) of males were found among drug-resistant cases than drug susceptible cases. 43.8% of patients took longer than 30 days to seek medical care and in the MDR group 25% of the cases did not undergo any previous anti-TB treatment. In our samples we found a proportion of 48.3% of MDR-TB. The T family was the most frequent spoligotype family. Compared with the proportion method, the sensitivity and specificity of the MTBDRplus assay were 82% and 94% for RIF-resistance, 60% and 94% for INH resistance. Compared with sequencing, the sensitivity and specificity of the MTBDRplus assay were 92% and 97% for RIF-resistance, 100% and 100% for INH-resistance. To detect RIF and INH-resistance, the Detect-TBMDR assay showed a sensitivity and specificity of 79.3% and 77.0%, and 100% and 65%, respectively, compared to proportion method. When compared with sequencing, Detect-TBMDR assay, to detect RIF and INH-resistance, showed a sensitivity and specificity of 81.2% and 94.7% and to 100% and 96.2%, respectively. Discordances still exist between the proportion method and molecular approach, particularly regarding INH-resistance. However, these methods are very important for the management faster and correct patient, helping to choose the best treatment regimen.

¹Ph.D. thesis, Graduating Program in Cellular and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (XXXp) July, 2013.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose e epidemiologia

“The struggle [against tuberculosis] has caught hold along the whole line and enthusiasm for the lofty aim runs so high that a slackening is no longer to be feared. If the work goes on in this powerful way, then the victory must be won” (ROBERT KOCH, 1905)

Foi com essas palavras poderosas e otimistas que Robert Koch, descobridor do bacilo da tuberculose (TB), concluiu sua palestra quando ganhou o Nobel em 12 de dezembro de 1905. Com a convicção da natureza infecciosa da doença e a importância de se isolar os indivíduos infectados para diminuir a transmissão, e convencido da necessidade de melhorar o ambiente social de pacientes com TB, Koch estava confiante de que a sociedade poderia ganhar a batalha contra esta doença. (LIENHART *et al.*, 2012). Mais de 130 anos depois ainda existem muitos desafios a serem enfrentados. A melhora do saneamento básico e condições de vida reduziram significativamente a incidência da TB, mesmo antes do advento da quimioterapia. A introdução de quimioterapia em 1950, juntamente com o uso disseminado da vacina BCG, teve um grande impacto na redução da incidência da doença. No entanto, apesar desses avanços, a TB continua a ser uma das principais doenças infecciosas em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento (LIENHART *et al.*, 2012).

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a TB uma emergência mundial de saúde pública, em um momento em que o número estimado de casos era de 7-8 milhões e de mortes de 1,3-1,6 milhões a cada ano. A TB é a segunda principal causa de morte em todo o mundo entre as doenças infecciosas, depois do HIV, que causou cerca de 1,8 milhões de mortes em 2008 (WHO, 2011).

Segundo a OMS, em 2010 foram diagnosticados e notificados 6,2 milhões de casos de tuberculose no mundo. Destes, 5,4 milhões tiveram TB pela primeira vez e 0,3 milhões tiveram um episódio recorrente de TB após cura. Além de um pequeno número de casos, cuja história de tratamento não foi registrada, os 0,4 milhões

restantes já haviam sido diagnosticados com TB, mas tiveram seu tratamento alterado para um esquema de retratamento após falha ou interrupção.

Nos últimos cinco anos tem sido observado um aumento no número de pacientes com TB possuindo cepas multi droga resistente (MDR), TB resistente à rifampicina (RIF) e à isoniazida (INH). Globalmente, o número relatado de pacientes inscritos em tratamento de TB-MDR foi de 46 000 casos em 2010. No entanto, isso foi equivalente a apenas 16% dos 290 000 casos estimados de TB-MDR entre os pacientes de TB notificados em 2010. O número de casos da doença testados e diagnosticados para TB-MDR que foram tratados com sucesso estão muito aquém das metas estabelecidas no Plano Global. Em todo o mundo, menos de 5% dos pacientes com TB, novos e previamente tratados, foram testados para TB-MDR em 2010 (WHO, 2011). Dados referentes a 116 países mostram uma proporção de casos novos de TB com 17% de resistência a qualquer medicamento, 10,3% à INH, e TB-MDR de 2,9%. Para casos com tratamentos prévios, resistência de 35% a qualquer medicamento, 27,7% à INH, e multirresistência de 15,3% (BRASIL, 2010a).

Em 1996, realizou-se no Brasil o I Inquérito de Resistência aos Medicamentos Antituberculose, que revelou proporções de 8,5% e 21% de resistência a qualquer medicamento para casos novos de TB e para casos com tratamento prévio, respectivamente. A resistência à INH para os casos novos de TB e para os casos com tratamento prévio foi de 4,4% e 11,3%, respectivamente. Para a multirresistência, as proporções para casos novos e com tratamento prévio foram de 1,1% e 7,9%, respectivamente. Em fase final de análise está o II Inquérito Nacional de Resistência, cujos resultados preliminares revelam aumento nas taxas de resistência primária à INH de 4,4% para 6% e a multiresistência primária de 1,1 para 1,4% (BRASIL, 2009; BRASIL, 2011).

Havia uma estimativa de 6.300 casos de TB-MDR entre os casos notificados na região das Américas em 2009. Seis países (Peru, Brasil, México, Equador, República Dominicana e Haiti) foram responsáveis por 80% de todos os casos de TB-MDR estimados na região. No Brasil, a prevalência estimada de MDR-TB variou entre 1% e 7% dos novos casos de TB notificados e entre 4% e 27% dos casos de retratamento notificados. Até o final de 2009, pelo menos um caso de TB extensivamente resistente aos medicamentos (TB-XDR) foi relatado em oito países. A pobreza é um fator importante da carga dessa doença, nas Américas e no mundo. Há uma relação log-linear negativa consistente entre o rendimento nacional bruto per

capita e a incidência de TB estimada nos países em 2009 (WHO 2009).

A maioria dos casos de multirresistência no mundo é adquirida por tratamentos irregulares e abandono. No Brasil, 96% dos casos de resistência notificados são adquiridos dessa forma, sendo que mais da metade tem um histórico de três ou mais tratamentos prévios para TB e coinfeção pelo HIV de 7% (BRASIL, 2007).

No Rio Grande do Sul foram registrados 6.646 novos casos de TB em 2012, tendo uma incidência de 46,8 por 100.000 habitantes em 2010 (Figura 1). Entre os moradores da capital é registrada uma média de 1.600 casos por ano, 70% destes por TB pulmonar. As populações mais vulneráveis são moradores de rua (incidência 60 vezes maior), presidiários (incidência 46 vezes maior) e índios (incidência 4 vezes maior). Porto Alegre tem uma população de aproximadamente 1.409.000, é considerado um dos 24 municípios prioritários do Estado, estando entre os 315 municípios do país com maior incidência da doença, que é de 110,5 por 100.000 habitantes (Figura 2) (SMS/POA, 2010; CEVS, 2012). No Rio Grande do Sul os percentuais de cura e abandono dos casos novos de TB bacilíferos em 2011 foram de 61,7% e 13,9%, respectivamente. Em 2011, 69 pacientes diagnosticados com TB-MDR iniciaram tratamento (CEVS, 2012). Na TB-MDR, que é uma preocupação mundial, a realização de cultura se faz primordial para o diagnóstico, em especial, para casos de retratamento, de não resposta ao esquema básico e populações mais vulneráveis. Porto Alegre descentralizou a cultura para hospitais e alcançou a meta de 40% no ano de 2010. A meta em 2011 foi aumentada para 60% e atingiu-se 55% como mostra a Tabela 1(SMS/POA 2012).

Tabela 1: Casos e Percentual de cultura de escarro no retratamento (recidiva e reingresso pósabandono) de casos pulmonares e pulmonares+extrapulmonares com baciloscopia positiva.

	Retratamento	Retratamento c/ cultura	% de tratamento com cultura
2010	281	157	55,87
2011	321	177	55,14
2012	275	174	63,27

Fonte: SINAN-NET/EVDT/CGVS/SMS/POA
Dados atualizados em 16/11/2012

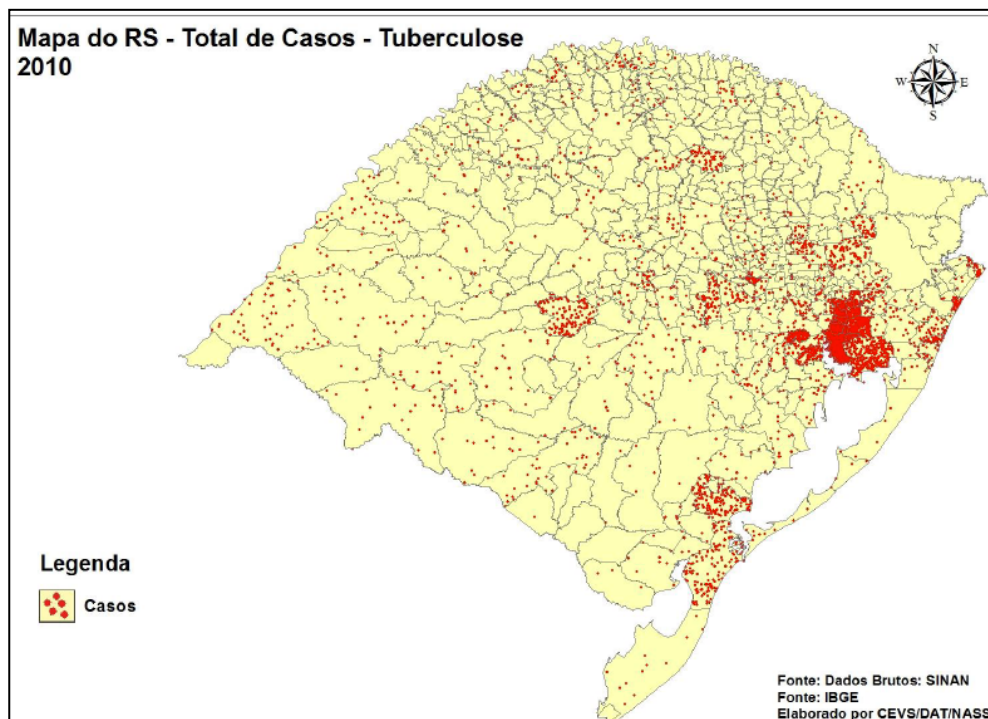


Figura 1: Representação gráfica da distribuição de casos de tuberculose no Rio Grande do Sul em 2010.

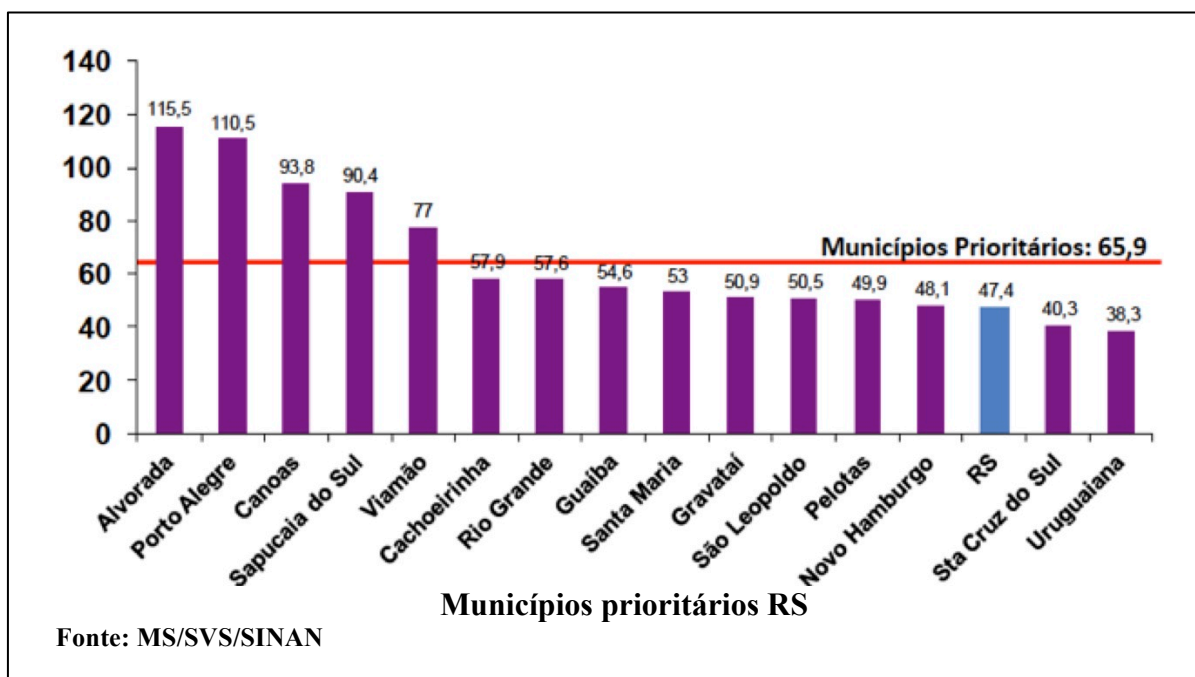


Figura 2: Taxa de incidência de tuberculose por municípios prioritários, no Rio Grande do Sul, 2011 (por 100.000 hab).

O Hospital Sanatório Partenon, situado em Porto Alegre, é um hospital de referência para tratamento da TB sensível e TB-MDR no RS. Este ambulatório atende pacientes da área leste de Porto Alegre, provenientes dos bairros Agronomia, Lomba

do Pinheiro, Partenon e bairros adjuntos, que conforme a Secretaria Municipal de Saúde que estão localizados na Gerência Distrital Partenon - Lomba do Pinheiro (GD 7), abrangendo uma população de aproximadamente 180.000 habitantes. A GD 7 apresentou um coeficiente de incidência de 138,5 casos por 100.000 habitantes, maior que o coeficiente da cidade para o ano de 2006 (93/100.00). Esta região também apresenta a taxa mais alta de infecção por HIV em Porto Alegre, 110,2 casos por 100.000 habitantes, enquanto a média para a capital é de 78,5 casos por 100.000 (Figura 3) (SMS/POA, 2008).

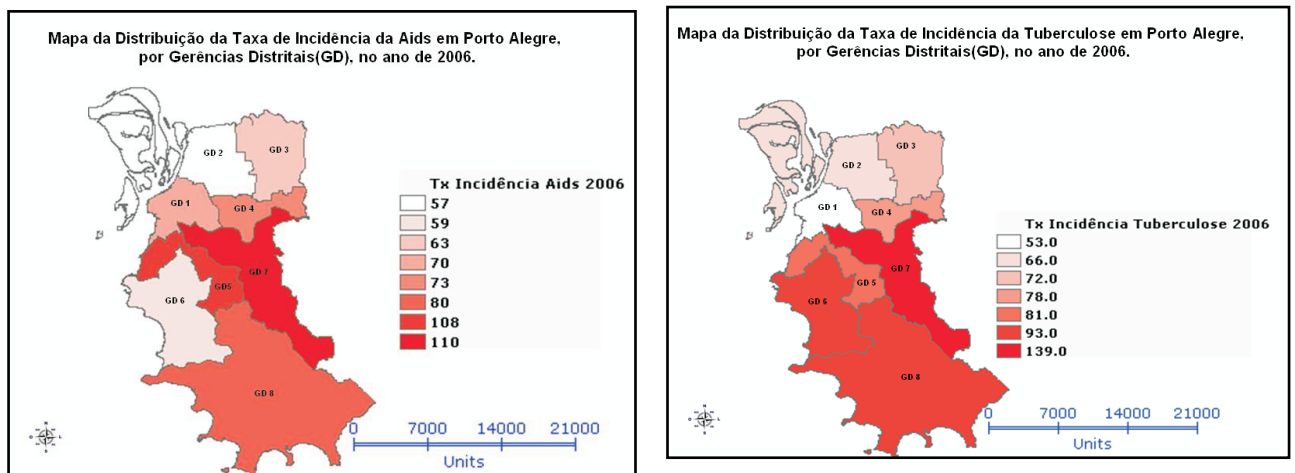


Figura 3: Mapas da distribuição de TB e AIDS nas Gerências Distritais de Porto Alegre.

GD1: Centro; GD2: Noroeste/Humaitá-Navegantes-Ilhas; GD3: Norte/Eixo Baltazar; GD4: Leste-Nordeste; GD5: Glória-Cruzeiro-Cristal; GD6: Sul-Centro Sul; GD7: Partenon-Lomba do Pinheiro; GD8: Restinga-Extremo Sul.

1.2 Agente etiológico e características da infecção

O principal agente etiológico da TB é *M. tuberculosis*, também chamado de Bacilo de Koch (BK). É uma micobactéria pertencente à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e ao gênero *Mycobacterium*. O gênero *Mycobacterium* compreende cerca de 100 espécies, a maioria saprófitas de vida livre (ARANAZ *et al.*, 1999). *M. tuberculosis* é um bacilo não formador de esporos, sem flagelos e que não produz toxinas. É uma espécie aeróbica estrita, necessitando de oxigênio para crescer e se multiplicar.

Estudos taxonômicos demonstraram similaridades fenotípicas, relação de antígenos citoplasmáticos, homologia do DNA, entre as várias espécies oficialmente descritas. Assim, oficialmente fazem parte do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* as espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* – BCG; *M. africanum*, *M. microti*, *M.*

caprae e *M. pinnipedii*. A espécie *M. canetti*, descrita inicialmente por George Canetti em 1969, ainda não foi oficialmente reconhecida como membro do complexo (BRASIL, 2008).

Essas bactérias, possuem características taxonômicas comuns, como a presença de ácidos graxos de cadeia longa C60-C90 (ácidos micólicos), o DNA com 61% a 71% de teor de guanina e citosina (G+C), e álcool-ácido resistência quando expostas a coloração tintorial pelo método de Ziehl-Neelsen (GOODFELLOW & MAGEE, 1998). O conteúdo de G + C é constante em todo o seu genoma, indicando provável ausência de transferência horizontal de genes envolvidos com a patogenicidade (COLE *et al.*, 1998).

Uma característica amplamente estudada do complexo *M. tuberculosis* é a presença e distribuição de sequências ricas em DNA repetitivo, chamadas sequências de inserção (IS). O elemento IS6110, membro da família IS3, não é somente o mais abundante como também é o melhor caracterizado, sendo que o número de cópias varia de linhagem para linhagem. O tempo de geração de *M. tuberculosis* em meio sintético ou em animais infectados é de, aproximadamente, 20 horas. Isto contribui com a natureza crônica da doença e impõe prolongados regimes terapêuticos, o que dificulta a adesão ao tratamento dos pacientes portadores de TB ativa ou latente. Esta característica determina a reação inflamatória localizada (nódulo ou granuloma) e necrose tecidual (lesão cavitária) (FUCHS & WANNMACHER, 1992). As micobactérias podem entrar em um estado de dormência, no qual sobrevivem sem se dividir. Esta propriedade tem um importante significado clínico, já que a TB muitas vezes representa a reativação de uma infecção antiga, subclínica, ocorrida vários anos antes. A dormência permite que as bactérias permaneçam em pequenos grupos populacionais, dificultando de uma maneira geral a erradicação da doença (COLSTON & COX, 1999).

O uso isolado de apenas um medicamento seleciona mutantes resistentes resultando na resistência natural, primária e adquirida, e a conseqüente necessidade da associação de fármacos em qualquer esquema terapêutico. Com base nos modelos *in vitro* e *in vivo*, atualmente compreende-se bem as particularidades da multiplicação diferenciada do *M. tuberculosis*, conforme a oferta de oxigênio. Isto é, distintas velocidades de crescimento nos meios intra e extra celulares, nas lesões caseosas fechadas, e nas paredes das lesões cavitárias. Com isso se diferenciam populações de multiplicação geométrica (mais sensíveis à ação dos medicamentos) daquelas

persistentes (multiplicação lenta ou intermitente), que exigem tempo prolongado de uso dos medicamentos para sua eliminação (DALCOLMO *et al.*, 2007). Estima-se que, durante um ano, um indivíduo com a forma pulmonar bacilífera poderá infectar, em média, de 10 a 15 pessoas. A probabilidade de o indivíduo ser infectado e de que essa infecção evolua para a doença depende de múltiplas causas, destacando-se a idade avançada, as condições sócio-econômicas e algumas condições médicas, como diabetes mellitus, alcoolismo, tabagismo, transplantes de órgãos sólidos, insuficiência renal crônica, uso prolongado de corticosteróides ou outros imunossupressores e infecção por HIV (BRASIL, 2002a).

1.3 Tratamento

A TB é uma doença grave, porém curável, em praticamente 100% dos casos novos,. O tratamento dos bacilíferos é a atividade prioritária de controle da TB, uma vez que permite anular rapidamente as fontes de infecção. Poucos dias após o início da quimioterapia correta, os bacilos praticamente perdem seu poder infectante. A Secretaria da Saúde preconiza que o tratamento seja realizado em regime ambulatorial, supervisionado, no serviço de saúde mais próximo, na residência ou no trabalho do doente (BRASIL, 2010b).

No Brasil, até o ano de 2009, o esquema terapêutico disponível e utilizado para o tratamento de primeira linha da TB era composto por 3 fármacos (INH, pirazinamida (PZA e RIF) empregados na primeira fase (2 meses de tratamento), seguido de INH e RIF empregados na segunda fase (4 meses de tratamento) (Tabela 2). A partir de 2010, foi introduzida a 4^o droga, etambutol (EMB), na primeira fase do tratamento dispensada na forma de comprimido de dose fixa combinada, ou seja, todos os fármacos em um único comprimido, seguido de 2 fármacos (INH e RIF) na segunda fase (Tabela 3) (Brasil, 2002b).

A introdução do EMB como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento do esquema básico teve como justificativa a constatação do aumento da resistência primária à INH (de 4,4 para 6,0%) e a resistência primária à INH associada à RIF (de 1,1 para 1,4%), observado no II Inquérito Nacional de resistência aos fármacos anti-TB conduzido em 2007-2008, em comparação com os resultados do I Inquérito Nacional, realizado no período de 1995 a 1997. A segunda mudança consistiu em

introduzir a apresentação em comprimidos com dose fixa combinada dos 4 fármacos (4 em 1) para a fase intensiva do tratamento. Os comprimidos são formulados com doses reduzidas de INH e PZA em relação às atualmente utilizadas no Brasil (BRASIL, 2009). Essa recomendação e apresentação (forma farmacêutica) são preconizadas pela OMS e utilizadas na maioria dos países (BRASIL, 2010b). No Hospital Sanatório Partenon, localizado em Porto Alegre a mudança no esquema terapêutico foi realizada no início de 2010.

Tabela 2. Esquemas de tratamento da TB utilizados no Brasil de 1979 a 2009.

Esquemas de Tratamento da TB		
Sem tratamento anterior, casos novos de todas as formas exceto meningoencefalite	Esquema 1	2 meses: RIF / INH / PZA 4 meses: RIF / INH
Com tratamento anterior, casos de retratamento em recidivas ou retorno após abandono do esquema 1	Esquema 1	2 meses: RIF / INH / PZA
	Reforçado	4 meses: RIF / INH / EMB
Meningoencefalite tuberculosa	Esquema 2	2 meses: RIF / INH / PZA
Casos de meningite tuberculosa		7 meses: RIF / INH
Falência do esquema 1 ou esquema 1 reforçado e casos de falência do 1, 1R ou 2	Esquema 3	3 meses: SM / ETH / PZA 9 meses: ETH / EMB

ETH, etionamida; EMB, etambutol; SM, estreptomicina; PZA, pirazinamida; RIF, rifampicina; INH, isoniazida. Adaptado de Brasil, 2002b.

Tabela 3. Esquemas terapêuticos básicos utilizados no Brasil a partir de 2010.

Esquema terapêutico	
Esquema Básico adultos	2 meses: RIF / INH / PZA/ EMB
	4 meses: RIF / INH
Esquema Básico Crianças	2 meses: RIF / INH / PZA
	4 meses: RIF / INH
Esquema Tuberculose Meningoencefálica	2 meses: RIF / INH / PZA/ EMB
	7 meses: RIF / INH

EMB, etambutol; PZA, pirazinamida; RIF, rifampicina; INH, isoniazida. Adaptado de BRASIL, 2010b.

As drogas anti-TB podem ser categorizadas em antimicrobianos de primeira (mais eficientes e menos tóxicos) e segunda linha. Os de primeira linha são: INH, RIF, PZA, EMB e SM; e os de segunda linha: KAN, AMK, CAP, cicloserina, PAS, etionamida e fluoroquinolonas (ZHANG *et al.*, 2005).

1.4 Resistência aos fármacos

M. tuberculosis é naturalmente resistente a vários antibióticos, tornando o tratamento mais difícil. Esta resistência é devida principalmente ao envelope celular altamente hidrofóbico atuando como uma barreira de permeabilidade, mas muitos potenciais determinantes de resistência também são codificados no genoma (COLE *et al.*, 1998). Isso inclui enzimas hidrolíticas ou modificadoras de drogas como as β -lactamases e acetil-aminoglicosídeo-transferases e bombas de efluxo de drogas.

Quanto a resistência adquirida, as bases genéticas da resistência a um medicamento anti-tuberculose é devido a mutações cromossômicas espontâneas em uma frequência de 10^6 para 10^8 divisões, para três medicamentos utilizados simultaneamente se torna 10^{18} a 10^{20} (ZHANG & YEW 2009). No entanto, esta taxa pode ser reduzida, devido à intervenção humana, incluindo a prescrição inadequada e a má aderência ao tratamento (GILLESPIE, 2002). A resistência ocorre inicialmente a uma droga do esquema, seguindo-se o desenvolvimento de resistência às outras, esse estado reflete a acumulação de etapas de mutações individuais de diversos genes independentes, e não a aquisição em bloco de resistência a múltiplas drogas (BARROSO *et al.*, 2003). A Tabela 4 descreve os diferentes mecanismos de resistência. O elemento crucial no surgimento de linhagens resistentes é a ausência de um sistema organizado para assegurar um rápido diagnóstico, um tratamento eficiente e uma supervisão dos casos de TB. Por essa razão, o nível de resistência aos fármacos anti-TB em uma população é um bom indicador do programa nacional de controle dessa doença (WHO, 1997). A posterior transmissão de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a partir do paciente índice para outros agrava o problema.

A TB-XDR é a TB-MDR que é adicionalmente resistente a pelo menos uma das fluoroquinolonas e mais uma das três drogas injetáveis de segunda linha, amikacina (AMK), kanamicina (KAN) e/ou capreomicina (CAP) (WHO, 2010). A resistência em consequência da utilização incorreta dos fármacos e subsequente seleção e multiplicação de linhagens resistentes a um ou mais fármacos pode ser classificada em resistência adquirida ou secundária. Já a resistência decorrente da infecção de indivíduos sadios com o bacilo já resistente é chamada de resistência primária (BRASIL, 1992).

1.5 Mecanismo de ação e resistência aos principais fármacos anti-TB

1.5.1 Isoniazida

INH é a droga anti-TB de primeira linha mais amplamente utilizada. Desde a sua descoberta em 1952, INH tem sido a principal droga em todos os regimes eficazes para o tratamento da TB e da infecção latente. *M. tuberculosis* é altamente susceptível à INH. A INH só é ativa contra o bacilo em replicação ativa, e não é ativo contra bacilos não-replicantes ou em condições anaeróbicas (ZHANG & YEW, 2009). Ela é uma pró-droga que requer a ativação pela enzima catalase-peroxidase da bactéria para gerar vários radicais reativos, que então atuam em diversos alvos no bacilo. O alvo mais conhecido é a via de síntese do ácido micólico da parede celular, onde pelo menos duas enzimas enoil-ACP redutase (InhA) e β -cetoacil ACP sintetase (KasA) têm sido identificadas como alvo da inibição pela INH (ZHANG, 2005). A resistência à INH ocorre com mais frequência do que para a maioria das drogas anti-tuberculose, a uma frequência de 10^5 a 10^6 bacilos, *in vitro*. Isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes à INH, muitas vezes perdem a enzima catalase-peroxidase codificado por *katG*, especialmente nas cepas resistentes de alto nível (MIC > 5 $\mu\text{g/ml}$), cepas resistentes de baixo nível (MIC < 1 $\mu\text{g/ml}$), muitas vezes ainda possuem atividade catalase (MIDDLEBROOK, 1954; WINDER, 1982). Os mecanismos genéticos determinantes da resistência à INH parecem ocorrer em diferentes níveis: (i) bloqueio da ativação do fármaco, relacionado com o gene *katG*, (ii) inativação do intermediário tóxico da INH, atividade associada com o gene *ahpC*, (iii) bloqueio da biossíntese dos ácidos micólicos (*inhA* e *mabA*) (ZHANG & YEW, 2009; VILCHÈZE & JACOBS Jr, 2007). A mutação em *katG* é o principal mecanismo de resistência à INH. A mutação *KatG* S315T é a mutação mais comum em cepas resistentes à INH, sendo responsável por 50-95% dos isolados clínicos resistentes à INH (ZHANG *et al.*, 1992; ZHANG & TELENTI, 2000).

1.5.2 Rifampicina:

RIF é um importante fármaco de primeira linha para o tratamento da TB. RIF é ativo contra os bacilos, tanto na fase de multiplicação como na estacionária em que o bacilo apresenta baixa atividade metabólica. Devido a isso possui alta atividade esterilizante *in vivo*, correlacionando-se com a sua capacidade de encurtar o tratamento da TB de 12-18 meses para 9 meses (MITCHISON, 1985). A RIF interfere na síntese de RNA por ligar-se à subunidade β da RNA polimerase. Em *M.*

tuberculosis, a resistência à RIF ocorre em uma frequência de 10^7 a 10^8 . Como em outras bactérias, mutações numa região bem definida de 81 pares de bases (pb) pares de base do gene *rpoB* são encontrados em cerca de 96% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à RIF (TELENTI *et al.*, 1993). Mutações nas posições 531, 526 e 516 estão entre as mutações mais frequentes em linhagens resistentes à RIF. Mutações no gene *rpoB* geralmente resulta em resistência de alto nível (MIC > 32 ug/ml) e uma resistência cruzada a todas as rifamicinas. No entanto, mutações específicas nos códons 511, 516, 518 e 522 estão associadas com a resistência de nível inferior à RIF e rifapentine, mas mantêm a suscetibilidade à rifabutina e rifalazil (BODMER, *et al.*, 1995; WILLIAMS *et al.*, 1994).

Um achado intrigante e potencialmente preocupante é a observação de linhagens RIF-dependentes de *M. tuberculosis* em ambientes clínicos. Essas cepas tem um crescimento fraco em meio a base de ovo, mas crescem melhor na presença de RIF (ZHANG & YEW, 2009). As circunstâncias em que as linhagens dependentes de RIF surgem permanecem obscuras, mas muitas vezes ocorrem como MDR-TB e parecem desenvolver-se quando ocorre repetição do tratamento em pacientes com rifamicinas. A utilização contínua de rifamicinas para o tratamento de pacientes portadores de cepas dependentes de RIF pode agravar a doença (ZHANG & YEW, 2009).

1.5.3 Estreptomicina

SM é um antibiótico aminoglicosídeo, que é ativa contra uma variedade de espécies bacterianas, incluindo *M. tuberculosis*. SM mata o bacilo da TB que está multiplicando ativamente, mas é inativo contra bacilos na fase estacionária ou intracelular (MITCHISON, 1985). SM inibe a síntese de proteínas por ligação à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, causando leitura errada do RNA mensageiro (mRNA) durante a tradução. Os alvos da ação da SM na subunidade 30S do ribossomo são a proteína ribossômica S12 (codificada pelo gene *rpsL*) e o rRNA 16S (codificado pelo gene *rrs*). Mutações em *rpsL* e *rrs* são os principais responsáveis pela resistência à SM, representando, respectivamente, cerca de 50% e 20% das cepas resistentes à SM. A mutação mais comum em *rpsL* ocorre no códon 43, levando a substituição de lisina para arginina na proteína, causando alto nível de resistência à SM. Mutação no códon 88, levando a troca do aminoácido lisina por arginina também é comum. As mutações no gene *rrs* ocorrem nas regiões próximas dos nucleotídeos

530 e 915 (FINKEN, *et al.*, 1993; HONORE & COLE, 1994).

No entanto, cerca de 20-30% de cepas resistentes SM com um baixo nível de resistência (MIC <32 µg/ml) não possuem mutações em *rpsL* ou *rrs*, 101, o que indica outro mecanismo (s) de resistência. Recentemente, foi observado que mutações no gene *gidB*, que codifica uma 7-metilguanosina metiltransferase específica para o 16S rRNA, estão associadas com a resistência em baixo nível a SM em *M. tuberculosis*. As mutações nesse gene têm sido observadas em alta frequência em isolados clínicos de *M. tuberculosis* (OKAMOTO *et al.*, 2007, SPIES *et al.*, 2008).

1.5.4 Pirazinamida

PZA é uma importante droga de primeira linha usada junto com INH e RIF. PZA desempenha um papel único na redução do tratamento da TB, que anteriormente era de 9-12 meses e passou para 6 meses, porque ela mata uma população de bacilos persistente em ambiente de pH ácido, que não são mortos por outras drogas. PZA só é ativa contra *M. tuberculose* em pH ácido (por exemplo, pH 5.5) (MITCHISON, 1985).

A PZA é um pró-fármaco que requer a conversão à sua forma ativa, o ácido pirazinóico (POA), pela enzima pirazinamidase / nicotinamidase codificada pelo gene *pncA* de *M. Tuberculosis* (SCORPIO & ZHANG, 1996). Cepas de *M. tuberculosis* resistentes à PZA perdem a atividade pirazinamidase/nicotinamidase. Vários estudos com clones de *M. tuberculosis* mostraram que a atividade defeituosa da pirazinamidase é devido a mutações no gene *pncA* e é a principal causa de resistência à PZA (SCORPIO & ZHANG, 1996; MESTDAGH *et al.*, 1999; JUREEN *et al.*, 2008). A percentagem mais baixa de cepas resistentes à PZA com mutações relatadas no gene *pncA* em alguns estudos podem ser causadas por falsas resistência devido a problemas bem conhecidos no teste de susceptibilidade à PZA (ZHANG AND MITCHISON, 2003)

1.5.5 Etambutol

EMB é um fármaco de primeira linha, que é utilizado em combinação com RIF e PZA para evitar o aparecimento de resistência aos fármacos. EMB é um agente bacteriostático, que é ativo em bacilos na fase crescente e não tem nenhum efeito sobre o bacilo não replicante. O EMB interfere na biossíntese de arabinogalactano da parede celular. Seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da incorporação do

ácido micólico, essencial para a formação da parede micobacteriana (TAKAYAMA & KILBURN, 1989).

Arabinosil transferase, codificada pelo gene *embB*, é uma enzima envolvida na síntese de arabinogalactano, e tem sido proposta como o alvo do EMB, no *M. tuberculosis* (TELENTI *et al.*, 1997). As mutações que causam resistência à EMB ocorrem com uma frequência de 10^5 . As mutações no operom *embCAB*, em particular *embB*, e ocasionalmente *embC*, são responsáveis pela resistência ao EMB. A mutação no códon 306 do *embB* é a mais frequente em isolados clínicos resistentes à EMB, representando 68% das cepas resistentes (SREEVATSAN *et al.*, 1997; RAMASWAMY *et al.*, 2000).

1.5.6 Kanamicina e Capreomicina

Kanamicina (KAN) é um aminoglicosídeo que ocasionalmente é utilizado para tratar a TB-MDR estabelecida. Tal como a SM, a resistência a esse agente se desenvolve como um resultado de alterações no gene *rrs* (MAUS *et al.*, 2005). Mutações no gene que codifica o rRNA 16S (*rrs*) particularmente nas posições 1400, 1401, 1402, 1484, têm sido identificados como as causas primárias de resistência a KAN (MAUS *et al.*, 2005; FEUERRIEGEL *et al.*, 2009; ALMEIDA DA SILVA & PALOMINO, 2011).

Capreomicina (CAP), uma droga importante para o tratamento de TB multirresistente, é um antibiótico de peptídio macrocíclico produzido por *Saccharothrix mutabilis* subespécie *capreolus*. Tem sido sugerido que mutações no gene *tlyA* (codifica uma rRNA metiltransferase que modifica os nucleotídeos C1409 na hélice 44 do rRNA 16S e o nucleotídeo C1920 na hélice 69 do rRNA 23S) são responsáveis pela resistência a CAP (MAUS *et al.*, 2005).

1.5.7 Ofloxacina

A ofloxacina (OFL) pertence ao grupo das fluoroquinolonas (FQ), que são potentes drogas de segunda linha recomendadas para tratar a TB MDR. Tem um baixo perfil de efeitos colaterais em comparação a outros agentes de TB e devido a sua alta atividade bactericida, seu uso tem aumentado nos últimos anos. Infelizmente, houve um aumento concomitante na resistência a fluoroquinolona (GINSBURG *et al.*, 2003). Todas as fluoroquinolonas funcionam de forma similar, através da inibição da

função da DNA girase micobacteriana, que é codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*.

Uma região particular referida como a região determinante de resistência à quinolona (QRDR) em *gyrA* tem sido identificada como a principal fonte de mutações que causam resistência à quinolona (VAN DOORN *et al.*, 2008). Aproximadamente 60-70% das cepas de *M. tuberculosis* resistentes à quinolonas, têm mostrado mutações na QRDR de *gyrA* (VAN DOORN *et al.*, 2008).

Tabela 4: Mecanismos de resistência às drogas em *M. tuberculosis*.

Droga (ano da descoberta)	CIM µg/ml	Gene(s) envolvidos	Função do gene	Papel	Mecanismo de ação	Frequência da mutação %
Isoniazida (1952)	0.02–0.2	<i>katG</i> <i>inhA</i>	Catalase-peroxidase Enoyl ACP reductase	Conversão da pró-droga Alvo da droga	Inibição da síntese de ácidos micólicos e outros múltiplos efeitos	50–95 8–43
Rifampicina (1966)	0.05–1	<i>rpoB</i>	subunidade β da RNA polymerase	Alvo da droga	Inibição da síntese de RNA	95
Pyrazinamida (1952)	16–50 (pH 5.5)	<i>pncA</i>	Nicotinamidase/ pyrazinamidase	Conversão da pró-droga	Depleção da energia da membrana	72–97
Ethambutol (1961)	1–5	<i>embB</i>	Arabinosyl transferase	Alvo da droga	Inibição da síntese de arabinogalactano	47–65
Streptomycina (1944)	2–8	<i>rpsL</i> <i>rrs</i> <i>gidB</i>	proteína ribossômica S12 16S rRNA rRNA methyltransferase (G527 na alça 530)	Alvo da droga Alvo da droga Alvo da droga	Inibição da síntese de proteínas	52–59 8–21 ?
Amikacina/ kanamicina(1957)	2–4	<i>rrs</i>	16S rRNA	Alvo da droga	Inibição da síntese de proteínas	76
Capreomycina (1960)		<i>thyA</i>	2'-O- methyltransferase			
Quinolonas (1963)	0.5–2.5	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i>	DNA gyrase subunidade A DNA gyrase subunidade B	Alvo da droga	Inibição da DNA girase	75–94
Ethionamida (1956)	2.5–10	<i>etaA/ethA</i>	Flavin monooxygenase	Conversão da pró-droga Alvo da droga	Inibição da síntese de ácidos micólicos	37 56
PAS (1946)	1–8	<i>inhA</i> <i>thyA</i>	Thymidylate synthase	Ativação da droga?	Inibição do metabolismo do ácido fólico e ferro?	36

CIM: Concentração inibitória mínima

Tabela adaptada de ZHANG & YEW, (2009).

1.6 Métodos para a detecção de resistência

1.6.1 Metodologias fenotípicas

São metodologias baseadas no crescimento de microrganismos na presença de uma concentração crítica de um fármaco anti-TB (HEIFETS *et al.*, 2000).

Método das Proporções

Esse método foi padronizado por Canetti, Rist e Grosset em 1963 (teste padrão) e em 1969 (teste simplificado). A versão simplificada do teste, com apenas uma concentração da droga, é a mais utilizada. Consiste em um método manual para detectar a proporção de bacilos resistentes presentes em uma amostra clínica, frente a uma concentração de fármaco, que é capaz de inibir o desenvolvimento dos bacilos

sensíveis mas não os resistentes. A cultura é feita em meio sólido LJ, a base de ovo, no qual as drogas são incorporadas antes da coagulação. No Brasil, esta é a metodologia recomendada pelo Ministério da Saúde para ser utilizada na rotina dos laboratórios de Bacteriologia da Tuberculose. Esta metodologia é sensível, de baixo custo, porém é laboriosa e fornece resultados somente depois de 60 dias, é considerada “padrão ouro” para a detecção de resistência em *M. tuberculosis* (CANETTI *et al.*, 1969; BRASIL, 2008). O método das proporções também pode ser realizado em meio de cultura sólido a base de ágar (Middlebrook 7H10), recomendado pelo *Center for Disease Control* (CDC). Essa variante utiliza drogas em concentrações diferentes daquelas utilizada nos meios a base de ovos (KENT & KUBICA, 1985).

BACTEC-MGIT 960

Disponibilizado no mercado pela empresa Becton & Dickinson Instruments System. É um método que utiliza um aparelho semi-automatizado e meio de cultura líquido (7H12A e 7H12B), feito com base fluorescente. De 4 a 12 dias, o crescimento do microrganismo é visualizado através de fluorômetro. A metodologia é sensível, porém é onerosa e depende de um aparelho importado (TORTOLI *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003).

MODS

Microscopic Observation Broth Drug Susceptibility Assay (MODS) é uma metodologia realizada em meio líquido (7H9), em microplacas, que depois de 10 dias podem ser observadas no microscópio invertido com filtro para campo escuro para visualizar o fator corda formado pela micobactéria (CAVIEDES *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2002).

D29-Phage assay

É uma metodologia manual realizada em meio líquido (7H9) que se baseia na capacidade do micobacteriófago D29 de infectar as células, quando a micobactéria é resistente aos fármacos. Quando o fago infecta a célula ele consegue lisar a parede celular detectando resistência. É uma metodologia trabalhosa que requer habilidade (MCNEMEY *et al.*, 1998).

MÉTODOS REDOX

Essa metodologia quantitativa da concentração mínima da droga capaz de inibir o crescimento do microrganismo é realizada em microplacas utilizando meio líquido 7H9. Os métodos colorimétricos para detecção de resistência aos fármacos em *M. tuberculosis* são baseadas na redução de um indicador de oxidação-redução adicionado a um meio de cultura líquido, após o *M. tuberculosis* ser exposto *in vitro*, a diferentes antibióticos. A resistência é detectada por uma mudança na cor do indicador de oxidação-redução, a qual é diretamente proporcional ao número de micobactérias viáveis no meio. Esta metodologia é manual, trabalhosa e tem custo elevado, pois é necessário o uso de corantes importados (PALOMINO *et al.*, 2002; MONTORO *et al.*, 2005).

1.6.2 Metodologias genotípicas

Nos últimos anos, a genética, bem como a biologia molecular, têm desenvolvido ferramentas importantes para o estudo dos microrganismos, assim como o estudo da resistência aos fármacos. O estudo de mecanismos moleculares de resistência aos agentes antimicrobianos tem como resultado o desenvolvimento de alguns ensaios de genotipagem rápida para a detecção de resistência aos fármacos. Porém, deve-se ter claro que as bases genéticas da resistência ainda não estão esclarecidas na sua totalidade para todos os fármacos usados no tratamento da TB (LAURENZO & MOUSA, 2011; BÖTTGER, 2011).

Sequenciamento de DNA

É baseado na técnica de PCR e gera dados de forma direta e confiável. Analisa todos os nucleotídeos de uma região escolhida específica do genoma. Permite estudar as mutações, detectando tanto as conhecidas como as ainda não conhecidas, através da análise e comparação de uma linhagem selvagem com uma resistente. Sendo possível identificar mutações na linhagem resistente que podem estar relacionadas com a resistência a determinado fármaco. É uma metodologia muito sensível, eficaz e confiável, considerada padrão ouro quando se trata de diagnóstico molecular. Porém é muito onerosa, pois utiliza aparelhos de alto custo (SOINI & MUSSER, 2001).

PCR-Heteroduplex

É uma metodologia baseada na amplificação de uma região de DNA

específica do genoma da micobactéria. Quando utilizado para a detecção de resistência à RIF amplifica-se uma região de 302 pb do gene *rpoB*. O produto amplificado de uma linhagem resistente é misturado com o volume igual do produto amplificado de uma linhagem sensível e esta mistura é aquecida a 95°C e congelada em seguida. O DNA híbrido dupla fita resultante é submetido à eletroforese em gel de agarose e os resultados são visualizados por coloração com brometo de etídio. Produtos heteroduplex (anelamento de amplificações de produtos de linhagens sensíveis e resistentes) exibem mobilidades eletroforéticas diferentes quando comparados a um homoduplex. Esta metodologia possibilita gerar o resultado em 24 horas, contudo o brometo de etídio é um reagente tóxico e teratogênico com dificuldade de ser desprezado no meio ambiente, o que dificulta o seu uso na rotina (WILLIAMS *et al.*, 1998).

PCR- Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP)

Essa metodologia permite a análise de uma região de interesse do genoma da micobactéria em um gel de poliacrilamida que é posteriormente corado com nitrato de prata. Existe um padrão de bandas, de uma linhagem selvagem, que é comparado com os vários padrões de bandas que aparecem nas linhagens resistentes. Por meio desta análise é possível identificar diferentes conformações de bandas (TELENTI *et. al.*, 1993a).

INNO-LiPA

É um teste comercializado pela empresa Innogenetics, Ghent, Bélgica. É baseado na amplificação por PCR de um segmento do gene *rpoB*. É uma metodologia colorimétrica baseada na hibridização reversa do produto amplificado do genoma da micobactéria com sondas específicas de uma região de 157 pb do gene *rpoB*, previamente fixadas numa membrana de nitrocelulose. Este método não é tóxico, é sensível, fácil e rápido, fornecendo resultados em 24 horas. Os resultados são visualizados através de sinais que aparecem na membrana depois de uma reação enzimática. Porém este teste tem um custo extremamente elevado e não está disponível no Brasil (TORTOLI & MARCELLI, 2007).

GenoType MTBDRplus

Esse teste é comercializado pela empresa Hain Lifescience, Nehren,

Alemanha. Também é uma metodologia colorimétrica baseada na hibridização reversa do produto amplificado do genoma da micobactéria com sondas específicas. Permite a identificação genética do complexo *M. tuberculosis* e da resistência à RIF e/ou INH a partir de amostras cultivadas ou diretamente de material pulmonar do paciente com microscopia positiva. A identificação da resistência à RIF é facultada pela detecção das mutações mais significativas do gene *rpoB*. Para testar o nível elevado de resistência à INH é examinado o gene *katG*, mais especificamente o códon 315. Recentemente, foi introduzido ao teste a região promotora do gene *inhA* para testar o nível baixo de resistência à INH. Este teste foi denominado GenoType MTBDRplus (SOMOSKOVI *et al.*, 2006). Também possui um custo elevado e não está disponível no Brasil.

DNA-Microarray

Essa metodologia é baseada na análise de regiões mutadas através de um padrão estabelecido por hibridização com um *chip* de oligonucleotídeos. O sistema é composto de uma matriz com várias sondas de DNA fixadas que, posteriormente, serão hibridizadas e os resultados registrados e interpretados usando-se programas de computador. O método é rápido e eficiente, porém requer pessoal treinado e tem custo elevado (KIVI *et al.*, 2002; SHIMIZU *et al.*, 2008).

Xpert MTB/RIF®

Esse teste é comercializado pela empresa Cepheid, Sunnyvale, California. É uma metodologia de amplificação de ácidos nucleicos que utiliza a PCR em tempo real, para detecção do complexo *M. tuberculosis* e para a triagem de TB resistente à RIF. Possui uma plataforma automatizada dos três processos (preparação de amostras, amplificação e detecção). O ensaio foi desenhado para amplificar uma sequência do gene *rpoB*, específica para membros do complexo *M. tuberculosis* e para investigar a presença de mutações no interior da RRDR (rifampin resistance-determining region) do gene *rpoB*, onde estão presente as principais mutações que conferem resistência à RIF (BOEHME *et al.*, 2010; HELB *et al.*, 2010).

1.7 Epidemiologia Molecular

A epidemiologia molecular utiliza concomitantemente técnicas de biologia molecular, que caracterizam o conteúdo nucleotídico e a epidemiologia clássica, que

estuda a distribuição e os fatores determinantes da doença nas populações humanas (FOXMAN & RILEY, 2001). Assim, sistemas que possam diferenciar cepas de *M. tuberculosis* epidemiologicamente relacionadas, das outras não relacionadas, são ferramentas poderosas numa investigação de surtos de infecção hospitalar, ou comunitária, bem como para diferenciar reativação endógena de uma re-infecção exógena.

A TB é um exemplo de doença infecciosa em que as técnicas de biologia molecular permitiram a obtenção de informações que seriam difíceis ou até mesmo impossíveis de serem conseguidas através de métodos laboratoriais convencionais. Ao longo das duas últimas décadas, o desenvolvimento de métodos para a epidemiologia molecular da TB contribuíram para uma melhor compreensão da doença e do seu agente causador, as bactérias do complexo *M. tuberculosis* (SHABBEER *et al.*, 2012).

Os métodos mais utilizados para diferenciar as cepas de *M. tuberculosis* utilizam técnicas baseadas no polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) da sequência de inserção IS6110, *spoligotyping* e unidade de repetição de micobactéria- repetição em tandem de número variável (*mycobacterial interspersed repetitive units- variable number of tandem repeats*, MIRU-VNTR) (MATHEMA *et al.*, 2006; GAGNEUX & SMALL, 2007).

IS6110 polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

Este método é baseado na técnica de hibridização e é considerado o padrão ouro entre os métodos de genotipagem de *M. tuberculosis* (VAN EMBDEN *et al.*, 1993). O método tem alto poder discriminatório para as cepas com o número de cópias de IS6110 maior do que seis. No entanto, cepas que possuam um número inferior a seis, podem apresentar padrões idênticos, mesmo não sendo epidemiologicamente relacionadas (GOULDING *et al.*, 2000) pois existem sítios preferenciais de integração do IS6110 no genoma de *M. tuberculosis* (FILLIOL *et al.*, 2000). Foi demonstrado que esse método pode ser usado para distinguir cepas estreitamente relacionadas, mas não é adequado para o estudo da história da evolução de cepas, uma vez que a ordem de eventos não pode ser inferida (FANG *et al.*, 1998). Além disso, esse método envolve um processo que requer sub-cultura de isolados para obter quantidades suficientes de DNA.

Spoligotyping

É uma técnica de hibridização reversa baseada em PCR para genotipagem do complexo *M. tuberculosis*. O método explora a variabilidade da região de repetição direta (DR) em *M. tuberculosis* para distinguir cepas (KAMERBEEK *et al.*, 1997). A base de dados internacional spoligotype SITVIT (SOLA *et al.*, 2001; BRUDEY *et al.*, 2006) representa a distribuição geográfica de bio-espoligotipos do complexo *M. tuberculosis* na população mundial. A versão mais recentemente publicada do banco de dados, SpolDB4, é composto de 39.295 amostras coletadas em mais de 120 países e contém 1.939 cepas diferentes ou tipos comuns (SITs) (SHABBEER *et al.*, 2012).

MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive units- variable number of tandem repeats)

Baseia-se na determinação do número de cópias de sequências nucleotídicas repetidas em *tandem*, em determinadas regiões do genoma (12, 15 ou 24 loci) de micobactérias, escolhidas pela sua estabilidade e poder discriminatório. Os VNTR têm sido especialmente úteis na genotipagem de bactérias patogênicas que possuem, à semelhança do complexo *M. tuberculosis*, um genoma muito conservado (SHABBEER *et al.*, 2012).

CAPÍTULO II

2.1 Justificativa

Apesar dos esforços para evitar a emergência de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos antimicrobianos, o surgimento destas linhagens tem contribuído significativamente para a manutenção da TB em nível mundial.

Os resultados do II Inquérito Nacional de TB demonstraram que as taxas de TB-MDR primária e secundária estão elevadas (CONDE *et al.*, 2009). A TB-MDR está relacionada com tratamento anterior em 90% dos casos o que reflete o uso inadequado dos medicamentos associada a taxas elevadas de abandono, que chegou a 25,6% nos casos de retratamento (BRASIL, 2010c). Atualmente, apenas cerca de 20% dos casos de retratamento realizam o exame de cultura no país (BRASIL, 2010c).

No Brasil existem poucos estudos de base populacional que estimaram a taxa de incidência de TB-MDR (TELLES *et al.*, 2005) e tem sido demonstrado que a prevalência pode variar de maneira importante entre as regiões e populações distintas (BRITO *et al.*, 2010, COELHO *et al.*, 2012, MATOS *et al.*, 2007, NATAL *et al.*, 2003, PINTO *et al.*, 2001). Os dados disponíveis mostram uma variação de 1-8% de TB-MDR entre todos os casos novos e 3-13% entre os pacientes com a doença tratados anteriormente (BRITO *et al.*, 2010, SANTOS *et al.*, 2010).

Em 2006, no encontro da OMS, em Genebra, também foi ressaltada a importância de estudos que visem o diagnóstico e a real prevalência de cepas TB-XDR em populações de TB-MDR, caracterização de mecanismos de resistência, além da viabilidade de testes de susceptibilidade a drogas de 2ª linha em laboratórios de micobacteriologia de rotina clínica nos diferentes países (WHO, 2008). No Brasil, até o momento nenhum estudo caracterizou a frequência de cepas XDR-TB dentre as cepas previamente caracterizadas como TB-MDR, especialmente em estados onde a incidência da doença é significativa.

O alto risco da transmissão do bacilo MDR e XDR atualmente constituem uma grande ameaça no controle da doença. Por essa razão, a rápida detecção de cepas resistentes a drogas tanto de primeira quanto de segunda linha contra *M. tuberculosis* tornou-se um componente chave para os programas de controle da doença (MARTIN & PORTAELS, 2007). A implantação de métodos que propiciem um diagnóstico rápido para TB-MDR pode ter os seguintes benefícios: a) Redução no tempo de uso de terapia imprópria ou sub-ótima pois essa pode favorecer à seleção de uma resistência adicional (TB-XDR). Ainda, é provável também, que o uso da terapia sub-

ótima favoreça a um mau prognóstico para o paciente. b) Abordagem clínica mais efetiva no atendimento do paciente. O isolamento precoce do paciente reduz a probabilidade da transmissão da TB.

Os métodos comerciais moleculares disponíveis como o kit INNO-LIPA Rif.TB (Innogenetics, Zwijndrecht, Bélgica) e o ensaio de GenoType® MDRTBplus (Hain Lifescience, GMBH, Alemanha) têm sido utilizados para detectar resistência à RIF e INH rapidamente, auxiliando nos casos de MDR. Os testes moleculares rápidos diminuíram o tempo de diagnóstico da TB-MDR de 2-3 meses (na cultura em meio sólido) para 2 dias. No entanto, esses testes comerciais, apesar de apresentarem boa aplicabilidade e serem de fácil execução, têm um custo elevado para uso na rotina laboratorial. Assim como os métodos de cultura líquida que permitem a obtenção de resultado em torno de 10 dias, mas requerem insumos e equipamentos caros, esses métodos não são adequados para a maioria dos países em desenvolvimento. Dessa forma, a implementação dos testes tradicionais em países em desenvolvimento é limitada pelo custo ou pelo tempo necessário para obtenção dos resultados. Além disso, os novos ensaios rápidos moleculares têm demonstrado eficácia sob condições controladas do laboratório, mas esta eficácia tem sido pouco avaliada em condições de rotina.

A informação da implementação do teste é exigida para identificar as dificuldades na execução, confirmar a performance (desempenho) do teste nestas áreas, indicar como o teste pode ser melhor aplicado e confirmar os benefícios da execução.

A rápida identificação das linhagens resistentes pode contribuir efetivamente no tratamento e controle da TB. A OMS passou a considerar a realização de pesquisas na área operacional e sistemas de saúde e, quando possível, em conjunto com atividades de pesquisa nas áreas básicas de desenvolvimento e avaliação de novos produtos como: novos fármacos, novas vacinas e novas abordagens diagnósticas para TB seja por meio de testes moleculares, imunossorológicos ou de tecnologia da informação.

2.2 Objetivos:

Geral

Avaliar a performance de novos métodos moleculares para detecção das mutações mais frequentes relacionadas com a resistência à RIF e INH em isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

Específicos

Avaliar o perfil resistência às drogas e conseqüentemente a frequência de cepas de *M. tuberculosis* multi-droga resistentes (TB-MDR),

Verificar quais as mutações mais frequentes nos genes que conferem resistência à RIF (gene *rpoB*) e INH (genes *katG* e *inhA*), em amostras de pacientes que possuem critérios para a realização do teste da suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA).

Verificar associação do perfil de resistência às drogas das cepas com os dados clínicos-epidemiológicos dos pacientes.

Realizar a genotipagem das amostras coletadas pelo método de *spoligotyping* e verificar se há associação com o perfil de resistência.

Avaliar a performance do teste comercial de biologia molecular para TB resistente, GenoType® MTBDRplus, a partir de DNA extraído diretamente de amostras clínicas (escarro), comparando com o sequenciamento de DNA e teste de suscetibilidade as drogas.

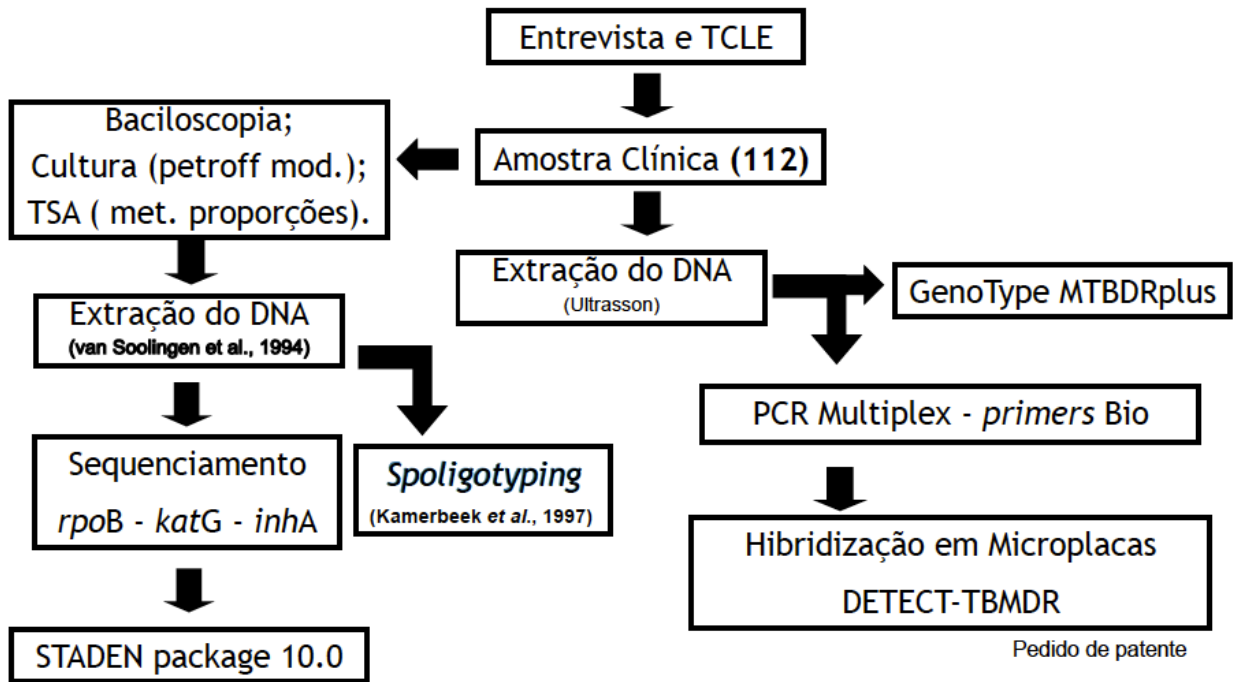
Desenvolver e padronizar um protocolo de hibridização/sistema de detecção colorimétrico em microplacas com DNAs extraído diretamente de amostras clínicas (escarro) para detecção das mutações mais frequentes relacionadas com a resistência à RIF (gene *rpoB*) e INH (genes *katG* e *inhA*).

Verificar a sensibilidade e especificidade do método molecular de hibridização em microplaca para detecção das mutações mais frequentes relacionadas com a resistência à RIF e INH, utilizando DNA de *M. tuberculosis* extraído diretamente de amostras clínicas.

Comparar os resultados obtidos do teste padronizado com sequenciamento, TSA e com teste comercial GenoType® MTBDRplus.

2.3 Organograma do estudo:

- Hospital Sanatório Partenon (Ambulatório), 2009-2011.



Capítulo III

Clinical data and molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients at higher risk of having MDR-TB.

Artigo em preparação para ser submetido à publicação no periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

CAPÍTULO III. Clinical data and molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients at higher risk of having MDR-TB.

Autores: Raquel de Abreu Maschmann^{1,2}, Fernanda Spies¹, Gisela Unis⁴, Arnaldo Zaha³, Maria Lucia Rosa Rossetti^{2,3}

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS - Porto Alegre, Brazil;

³Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴Hospital Sanatório Partenon (HSP), Porto Alegre, Brazil.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is one of the most harmful human pathogens worldwide. In most parts of the world, less than 5% of new and previously treated TB patients are tested for MDR-TB. In the Americas, 48% of patients with MDR-TB enrolled on treatment in 2009 were reported as having been successfully treated. In Rio Grande do Sul state, the southern most Brazilian state, approximately 4700 new cases of TB (42 cases/100 thousand) are recorded each year, with a cure rate of 68.9%, and a noncompliance rate of 7.5%. As is the case for other Brazilian regions, resistance in this region has been poorly investigated. The aim of this study was to characterize TB patients at higher risk of having MDR-TB. The patients that were enrolled in the study, answered a questionnaire, and provided a sputum sample. *M. tuberculosis* isolates were tested for drug susceptibility, typed by Spoligotyping analysis and genes associated with resistance to rifampin (*rpoB*) and isoniazid (*katG* and *inhA*) were sequenced. An important find was that a significantly higher proportion (75% versus 20%, $p = 0.009$) of males were found among drug-resistant cases than among drug susceptible cases. Another important finding was the delay of patients to seek medical care, since 43.8% of patients took longer than 30 days and that in 25% of the cases of the MDR group, did not undergo any previous anti-TB treatment. In our samples we found a proportion of 48.3% of MDR-TB. The T family was the most frequent spoligotype family with 36.2%, followed by LAM Family with 29.3%. No association between spoligotype superfamilies and drug resistance was found in our study. Effective control of the epidemic of drug-resistant TB in the study population must

aim to reduce both the transmission of bacilli as the occurrence of acquired resistance. This study demonstrates that the integration of drug susceptibility testing with genotyping and epidemiological data analysis represents a useful approach to studying the epidemiology of drug-resistant TB.

INTRODUCTION

Mycobacterium tuberculosis is one of the most harmful human pathogens worldwide. In 2011, there were an estimated 8.7 million new cases of TB (13% co-infected with HIV) and 1.4 million people died, including almost one million deaths among HIV-negative individuals and 430 000 among people who were HIV-positive (WHO 2012a). From 6.2 million people diagnosed with TB to national control programs, 5.8 million had TB for the first time and 0.3 million had a recurrent episode after being cured of TB in the past, 0.4 million had already been diagnosed with TB but had their treatment changed to a retreatment regimen after treatment failed or was interrupted (WHO 2012a). There has been an increase in the number of TB patients diagnosed with multidrug-resistance (MDR-TB), which are defined by simultaneous drug resistance to isoniazid (INH) and rifampin (RIF), in the last five years. Worldwide, 3.7% of new cases and 20% of previously treated cases were estimated to have MDR-TB (WHO 2012b).

In 2011, WHO estimated about 0.5 million new MDR-TB cases occurred among TB cases notified in the world. About 60% of these cases occur in Brazil, China, India, the Russian Federation and South Africa alone (WHO 2012b). However, patients enrolled on treatment for MDR-TB in 2010 only represented 16% of the MDR-TB cases estimated to exist among reported TB cases. In most parts of the world, less than 5% of new and previously treated TB patients are tested for MDR-TB (WHO 2011). In the Americas, 48% of patients with MDR-TB enrolled on treatment in 2009 were reported as having been successfully treated (WHO 2012b).

In Brazil, there are few population-based studies that have estimated the incidence rate of MDR-TB (Telles et al., 2005) and it has been shown that prevalence may differ in important ways among distinct regions and populations (Brito et al., 2010, Matos et al., 2007, Natal et al., 2003, Pinto et al., 2001, Coelho et al., 2012). The available data show a range from 1-8% of all new cases and 3-13% of previously treated TB patients (Brito et al., 2010, Santos et al., 2010).

In the Rio Grande do Sul (RS) state, the southern most Brazilian state, each

year are recorded approximately 4700 new cases of TB (42 cases/100 thousand), a cure rate of 68.9%, and a noncompliance rate of 7.5%. In the last decade, the recorded cases in RS increased from 5,300 notifications in 2001 to 6,300 in 2010, with an average of 450 deaths/year from TB (WHO 2011). Porto Alegre city, capital of Rio Grande do Sul State, has a population of approximately 1,409,000 and reports around 1600 new cases of TB annually, which gives an incidence of 112 per 100 000 population (CEVS-RS 2007). This incidence is almost three times the national average, requiring special attention due to the high number of patients, the increasing number of MDR TB cases and the high prevalence of HIV (35%) (WHO 2011). Most cases of MDR in the world are acquired by irregular treatment and abandonment. In Brazil, 96% of reported cases of resistance are acquired, and more than half have a history of three or more previous treatment for TB (MS/SVS 2007). The countries that have financial resources recommend performing the drug sensitivity testing (DST) for all patients at diagnosis, but Brasil do not follow this practice, and DST is then recommended for special cases. For the MDR-TB screening with DST, the Brazilian National Tuberculosis Control Programme (NTCP) guidelines included testing of high-risk TB patients who exhibited the following characteristics: presence of TB-HIV co-infection, suspected drug resistance due to treatment dropout, treatment failure, TB relapse or contact with an MDR-TB strain, suspected primary drug resistance and inclusion in a high risk group, such as health providers, the homeless and institutionalized populations (BRASIL 2008).

The aim of this study was to characterize the cases that have higher risk of having MDR-TB.

METHODS

Study Setting and Population

For this study we used the same population described in a previous study (Maschmann et al., 2013). However, different criteria for inclusion and exclusion were used, thus changing the number of samples used in analyses. The specimens were collected at Hospital Sanatório Partenon, a public reference hospital for treatment of TB, in Porto Alegre city and the only reference center for MDR-TB in the State (Plano Municipal de Saúde 2010-2013). In this prospective study, we enrolled patients at higher risk of having MDR-TB, aged >18 years with indication for culture and sensitivity test according to Brazilian NTCP guidelines who attended

at the ambulatory between August 2009 and June 2011. The patients were enrolled in the study after providing written informed consent, answering a questionnaire, and providing a sputum specimen. This project was approved by the Research Ethics Committee at the School of Public Health of Rio Grande do Sul State (protocol No. 465/09). The following variables were studied: sociodemographic characteristics, current and past history of TB and aspects related to TB diagnosis, treatment and comorbidities. Demographic, clinical and epidemiological data were collected prospectively using a semi-structured interview instrument that contained, among others, the following variables: age, gender, previous anti-TB treatment, and history of having abandoned treatment.

Inclusion criteria

To participate in the study, were selected patients in whom treatment failed, which abandoned the latter treatment or who had relapse after cure, which have confirmation of TB by cultural isolation of *M. tuberculosis*.

Exclusion criteria

All cases with new or extra-pulmonary TB or nontuberculous mycobacteria (NTM) were excluded. If cultures were negative, failed to grow, were contaminated or data were missing, the patients were excluded, as TB disease could not be confirmed.

Laboratory Methods

All primary specimens (sputum) were processed using internationally established standard methods. Specimens were decontaminated by Petroff's method. Microscopy (Ziehl–Neelsen) and smear grading was performed on all specimens according to WHO recommendations. (WHO 2003).

Culture and DST

Culture and DST were performed at the Mycobacteriology Section of the Biological Research Institute - Central Laboratory of Public Health of Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/RS), which is quality assured for microscopy by the National Reference Center Helio Fraga, and for DST by the Supranational Laboratory, Argentina. Culture was performed using two tubes containing Löwenstein–Jensen (LJ) medium and one tube containing LJ supplemented with paranitrobenzoic acid (PNB). *M. tuberculosis*

was identified by smear microscopy followed by a positive niacine reaction (Giampaglia et al., 2005). Non-tuberculous mycobacteria (NTM) were identified by assessing bacterial growth on PNB (24). The DST was performed using the proportion method on LJ medium under the following critical concentrations: 0.2 µg/ml INH, 40 µg/ml RIF, 4 µg/ml streptomycin (SM), and 2 µg/ml ethambutol (EMB) (Canetti et al., 1969). Readings were done weekly with a final reading after 6 weeks of incubation at 37 °C. We applied a critical proportion of 1% to denote an isolate as being resistant. PZA susceptibility testing in the Bactec MGIT 960 system (Becton Dickinson, Sparks, MD) was performed according to the manufacturer's instructions. (Becton Dickinson and Company. 1999. Bactec MGIT 960 system user's manual. Becton Dickinson and Company, Sparks, MD.) Method utilizes an acidified Middlebrook broth and a critical concentration of 100 µg/ml.

Spoligotyping

Spoligotyping was performed using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Isogen Biosciences B.V., The Netherlands) (Kamerbeek et al., 1997). A 100 ng of DNA extracted from culture were used for amplification of the direct repeat region. The spoligopatterns obtained were entered in a binary format as Excel spreadsheets (Microsoft, Redmond, Washington), compared with patterns in the SITVIT database (available from <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:0881/SITVITDemo/>) to identify the shared international types (SITs), and families were identified according to the SpolDB4 (Brudey et al. 2006).

Statistical analysis

Patient data were collected through epidemiological questionnaire and were analyzed using SPSS software 16 (SPSS, Chicago, IL). Values are expressed as mean ± standard deviation (SD) or numbers and percentages. Means were compared by ANOVA and comparisons of categorical variables were used chi-square tests or Fisher's exact two-tailed. P values <0.05 were considered significant.

Results

In the period of August 2009 and June 2011, 112 sputum specimens, samples that met the criteria for DST (i.e., had risk factors for MDR-TB) were collected. However, 44 were culture-negative, and therefore no conventional DST result was

available and for other seven, many data were missing. So, these 51 samples were excluded from the analysis.

Of the remaining 61 isolates, only two were smear-negative. The sputum positivity of the specimens was: three samples 1-9 AFB/100 fields, 23 samples 1+, 19 samples 2+ and 14 samples 3+. All cultures included in the study belong to *M. tuberculosis* complex (niacin positive and PNB negative). The 61 samples were from 56 patients, once, five of these had recurrent episode.

Host characteristics

Of the 56 study subjects, 34 (60.7%) were male and 22 (39.3%) were female. A significantly higher proportion (75% versus 20%, $p = 0.009$) of males were found among drug-resistant cases than among drug susceptible cases (Table 1). The age of the study patients ranged from 21 to 85 years old, with a mean of 44.6 (SD ± 15.3) years old. The mean of the ages did not differ statistically significantly between the three groups ($p = 0.153$) (Table 1). However the means were statistically significantly when comparing between the drug-susceptible group, and resistant plus MDR groups (35.4 versus 46.6 $p = 0.035$).

Table 1: Comparison between the means of the groups.

	Susceptible n=10	Resistant n=18	MDR n=28	p	total n=56
	mean (\pm SD)	mean (\pm SD)	mean (\pm SD)		mean (\pm SD)
Age (years)	35.4 (14.9)	46.4 (13.5)	46.7 (15.8)	0.153	44.6 (15.3)
num. treatment	2.9 (1.8)	2.2 (1.6)	3 (2.2)	0.483	2.7 (2.0)
BMI	20.2 (3.8)	20.4 (2.6)	19.1 (2.2)	0.455	19.7 (2.7)
Schooling (years)	6.4 (1.9)	5.8 (2.7)	5.9 (2.8)	0.793	5.9 (2.6)

SD = standard deviation; BMI = Body Mass Index; MDR= multidrug resistant

There were 35 caucasians (63.6%) and 20 non-whites (36.4%). The mean of schooling was 5.9 (SD ± 2.6) and was not statistically significant ($p = 0.793$) when comparing between the three groups.

Twenty-five patients (80.4%) reported previous anti-TB treatment (data were consistent between medical records and interview notes), even with no significant

differences among the 3 groups ($p = 0.549$), we can observe that in 25% of the cases the MDR group had no previous anti-TB treatment, the highest percentage between the three groups (Table 2). Seventeen (30%) patients reported having contact with a TB patient in the home and 10 (17.8%) in the penitentiary. The serological tests were made in 48 (85.7%) patients to check the positivity of HIV and 8 (16.7%) were serum positive; 4 of them were male (50%). In addition, 22 (40.0%) patients had comorbidities, 10 were drug users, 6 were diabetic, 5 were seropositive for HCV and one was using steroids. The treatment outcome most common was treatment failure in 53.5% (30/56) (Table I). Among the three groups, the differences of treatment outcome were not significant ($p = 0.344$), but it was possible to observe an increase in cases of treatment failure among groups presenting any resistance (66.7%) and MDR (53.6%) over susceptible ones (30.0%). Another important finding was the delay of patients to look for medical attention, 43.8% of patients took longer than 30 days. If we analyze the three groups, there was statistically significant difference ($p = 0.028$), since all patients in the susceptible group sought care in less than 30 days and in MDR and resistant groups, 52.9% and 62.5% of patients, respectively, took over 30 days to seek medical attention.

Table 2: Distribution of host characteristics between the cases drug susceptible, resistant and MDR.

Characteristic	susceptible	any resistance	MDR	P	Total
Gender (n=56)					
male	2 (20%)	11(61.1%)	21(75%)	0,009	34 (60.7%)
female	8 (80%)	7(38.9%)	7(25%)		22 (29.3%)
Race (n=55)					
Caucasian	8 (80%)	11 (64.7%)	16 (57.1%)	0.493	35(63.6%)
Non-white	2 (20%)	6 (35.3%)	12 (42.9%)		20(36.4%)
Previous anti-TB treatment (n=56)					
sim	9 (90.0%)	15(83.3%)	21 (75.0%)	0.549	45 (80.4%)
não	1 (10%)	3(16.7%)	7 (25%)		11 (19.6%)
HIV serology (n=48)					
yes	3 (33.3%)	1 (6.2%)	4 (9.5%)	0.436	8 (16.7%)
no	6 (66.7%)	15 (93.8%)	19 (90.5%)		40 (83.3%)
BCG vaccinated (n=42)					
yes	5 (71.4%)	9 (69.2%)	14 (63.6%)	0.904	28 (66.7%)
no	2 (28.6%)	4 (30.8%)	8 (36.4%)		14 (33.3%)
Comorbidity (n=55)					
yes	4 (36.4%)	5 (29.4%)	13 (48.1%)	0.980	22 (40.0%)
no	7 (63.6%)	12 (70.6%)	14 (51.9%)		33 (60.0%)
last treatment outcome (n=56)					
cure	3 (30.0%)	1 (5.6%)	5 (17.9%)	0.344	9 (16.1%)
abandonment	4 (40.0%)	5 (27.8%)	8 (28.6%)		17 (30.4%)
failure	3 (30.0%)	12 (66.7%)	15 (53.6%)		30 (53.5%)

treatment adherence (n=56)					
regular	3(37.5%)	5(33.3%)	12 (50.0%)		20 (42.6%)
irregular	5(62.5%)	10 (66.7%)	12 (50.0%)	0.563	27 (57.4%)
duration of symptoms *(n=56)					
<30	7 (100%)	3 (37.5%)	8 (47.1%)		18 (56.2%)
>30	0 (0%)	5 (62.5%)	9 (52.9%)	0.028	14 (43.8%)

MDR= multidroga resistente, *duration of symptoms before starting treatment

Spoligotyping and resistance analyses.

The 61 sputum samples were from 56 patients, because, five patients had recurrent episode in the period of the study. However, from these five samples, only two showed different spoligotype patterns from the first episode. Therefore, 58 samples were used for these analyzes.

Twenty-eight patients (48.28%, 28/58) had MDR *M. tuberculosis* isolates, being 14 (50%, 14/28) RIF/INH, 8 (28.6%, 8/28) RIF/INH/PZA, 4 (14.3%, 4/28) RIF/INH/SM and 1 (3.6%, 1/28) RIF/INH/SM/PZA, while any resistance was observed in 19 patients (32.8%, 19/58), 13 (68.4%, 13/19) INH-mono-resistant, one (5.3%, 1/19) SM-mono-resistant, 3 (15.8%, 3/19) INH/SM, 1 (5.3%, 1/19) RIF/PZA and 1 (5.3%, 1/19) INH/PZA. Eleven (19%, 11/58) isolates were susceptible. These samples were sequenced and the frequencies were present in another study (Maschmann et al, 2013)

A total of 6 spoligotype superfamilies with 28 different spoligotypes were identified. Forty-three isolates (74%) were included in 13-shared patterns and 15 (26%) were unique patterns. The T family was the most frequent family found in this population, with 21 strains (36.2%), 17 (81.1%) were T1, 2 (9.5%) were T2 and 2 (9.5%) were T5_MAD2. The Latin American and Mediterranean (LAM) family was represented by 17 (29.3%) strains presented this pattern, from which 5 (29.4%) were LAM9, 4 (23.5%) were LAM2, 3 (17.6%) were LAM3, 2 (11.8%) LAM6, and LAM1, LAM4 and LAM3 and S/convergent, one (5.9%) sample each. The Haarlem family comprised 4 (6.9%) strains and all were H3. Families U and X comprised 5(8.6%) and 4 (6.9%) strains, respectively. In addition, 7 (12.1%) strains presented with 6 different unknown patterns, which means that they did not match any SIT in the SITVIT database. Table 3 shows the frequency of each SIT found in the study and their spoligopattern and subfamily.

Although the T family is the most prevalent among the samples of this study, this was not observed when separated into groups. In the MDR group the most

Table 4: Comparison between resistance patterns and spoligotyping superfamilies.

Spoligotyping superfamily	LAM n(%)	T n(%)	X n(%)	H n(%)	U n(%)	Unknown n(%)	Total
susceptible	2 (18.2)	7 (63.6)	1 (9.1)	0 (0)	0 (0)	1 (9.1)	11 (18.9)
Any resistance	7 (41.2)	8 (42.2)	1 (5.3)	2 (10.4)	0 (0)	1 (5.3)	19 (32.8)
INH	5	4	1	2	0	1	13
SM	1	0	0	0	0	0	1
INH/SM	1	2	0	0	0	0	3
RIF/PZA	0	1	0	0	0	0	1
INH/PZA	0	1	0	0	0	0	1
MDR	8 (28.6)	6 (21.4)	2 (7.1)	2 (7.1)	5 (17.9)	5 (17.9)	28 (48.3)
RIF/INH	5	5	1	0	2	1	14
RIF/INH/PZA	2	0	0	1	3	3	8
RIF/INH/SM	1	1	1	0	0	1	4
RIF/INH/SM/PZA	0	0	0	1	0	0	1
Total	17(29.3)	21(36.2)	4(6.9)	4(6.9)	5(8.6)	7 (12.1)	58

SIT-863, LAM6 SIT-64 and Unk1) included exclusively MDR isolates. The biggest cluster with MDR isolates only was the U family (SIT-863) with five samples. There was no cluster that included exclusively susceptible isolates.

DISCUSSION

The aim of this study was to describe the data of cases presenting a higher risk of having MDR-TB through an integrated approach combining *M. tuberculosis* drug susceptibility testing, genotyping, and epidemiological data analysis. It is important to note that previous TB treatment was not monitored because at the time the patients were enrolled, direct observed treatment was not adopted. Only recently, there has been a change in Brazilian guidelines which recommend culture and sensitivity testing in all cases of re-treatment in cases of confirmed contact with MDR-TB, where sputum remains positive during the second month of treatment, and in cases with treatment failure (BRASIL, 2010).

Data on treatment adherence came from medical records and verification of leftover pills every month of treatment. Our study, with a self-administered treatment (SAT), found that 42.6% of the patients fully completed treatment without incident (Table 2). Another findings that shows the need for greater control over the adherence to treatment was that in 25% of MDR-TB cases had not been previously treated for tuberculosis and that a significantly higher proportion of patients who was MDR (52.9%) and resistant (62.5%) took over 30 days to seek medical attention (Table 2) compared to the group of susceptible patients. This may be due to an ineffective

control of patients with MDR-TB or a delay in seeking medical attention, causing a transmission of the MDR strain directly to other people. Other studies have shown that with the implementation of the DOT program, there was an improvement in treatment adherence and prevention in the acquisition of MDR-TB in populations with poor adherence or a high value of acquired MDR-TB (Juan et al., 2006, Chien et al., 2013). Among the data collected in the identification of each case, the best variable that can inform about the socioeconomic status is education. In Brazil, observed that the contagious cases of tuberculosis with no education have lower cure rate (66.4%) and percentage of treatment dropout was higher (9.5%), compared with schooling above eight years of education (77.2% and 6.3%, respectively) (BRASIL, 2012). In our study the mean of years of education was 5.9 (SD±2.6) agreeing that a less schooling leads to an increase in cases of failure or abandonment of treatment.

As expected, we found a high rate of failure (53.5%) (Table 2) among the cases studied, since this is one of the criteria to be considered in the risk group for MDR-TB. According to WHO, of the 22 TB high burden countries, 15 reached the 85% target. The seven countries that reported lower rates of treatment success were Brazil (72%), Ethiopia (84%), Nigeria (83%), the Russian Federation (55%), South Africa (77%), Uganda (67%) and Zimbabwe (78%). In Brazil and Uganda, low rates reflect a high proportion of patients for whom the outcome of treatment was not evaluated (11% and 16%, respectively) and high default rates (11% and 10%, respectively). In the Russian Federation, treatment failure rates are high, possibly linked to MDR-TB (WHO 2011).

Of the 48 patients tested we found a proportion of 16.7% of co-infected TB-HIV. When we analyzed the three groups, although not being statistically significant ($p = 0.436$), there are less HIV-positive patients in the resistant (6.2%) and MDR (9.5%) groups than in the susceptible group (33.3%), another study conducted in the city of Santos (Coelho, 2012) also showed that there are more co-infection between susceptible group than MDR-TB group. The cases of MDR-TB that were identified in our study were similar to those described in other studies conducted in Brazil (Telles et al. 2005, Dalcomo et al. 2007, Vieira et al. 2007, Brito et al. 2010, Santos et al, 2010) in that the cases involved predominantly working-age males and most of the cases had a prior history of TB treatment. When we analyzed all three groups there was statistically significant difference ($p = 0.009$), showing that the susceptible group had much less male patients (20%) than in the MDR group (75%).

In our samples we find the T family as the most frequent spoligotype family with 36.2% followed by LAM Family with 29.3%. However, Cafrune et al. (2009) in the same hospital at Porto Alegre, described that the spoligopatterns family distribution was similar to that reported for South America in general, the LAM family was the most frequent family (37%), the T family was represented with 27.4%, the Haarlem family comprised 11.1% and families U, S, and X comprised 8.9%, 6%, and 2.2% strains, respectively. In another study of isolates from 11 states of Brazil, the predominant MTC lineages in decreasing order belonged to the LAM (46%); the ill-defined T (18.6%); the Haarlem (12.2%), the X (4.7%), the S (1.9%), and the East African Indian (EAI) (0.85%) families (Gomes, et al. 2012). In a study (Perizzolo et al) at Rio Grande do Sul with only MDR strains, the most frequent spoligopatterns family distribution was 57.8% belonged to the LAM family, 18.2% were of the T family, 13.2% of the U family, 4.1% presented a Haarlem genotype and 1.65% belonged to the X family. The major cluster 18.2% was composed of samples with the LAM5 genotype (ST93). When analyze only the MDR samples in our study, we find almost the same distribution, the most common spoligopatterns family was 28.6% belonged to the LAM family, 21.4% were of the T family, 17.9% of the U family, 7.1% of the X family, and 7.1% of the H family. However, we did not find genotype LAM5 between samples of this study. This may characterize a change of strains circulating in the State of Rio Grande do Sul, as in the studies above the samples were from a previous period and this work samples were from 2009 to 2011 and also take into account the few number of samples studied.

Some previous studies found association between spoligotype superfamilies and drug resistance showing that the Beijing, LAM, and Haarlem families were associated with drug-resistant TB (Farnia et al., 200; Ignatova et al., 2006) and some found no association between spoligotype superfamilies and drug resistance (Asiimwe et al., 2008, Valcheva et al., 2018). In our study we did not find any significant statistically association between spoligotype and drug resistance, however, three clusters had (U SIT-863, LAM6 SIT-64 and Unk1) MDR-TB isolates only. Interestingly, in the cluster U (SIT-863) that had a larger number of samples, all the patients who had this pattern were in prison or had contact with people who have been in prison. These samples had the insertion of 12 nucleotides (CCAGAACAACCC) in the *rpoB* gene, described in a previous study with these samples (Maschmann et al, 2013). In another studies conducted in the same hospital, samples with the same

spoligotype pattern were described and all patients had a history of incarceration (Cafruni et al, 2007). The test of resistance to PZA is usually not performed in laboratory routine, because it is difficult to perform. Our results showed that 19% (11/58) of the samples tested were resistant to this drug. An important data, taking into account, that this drug is used in the basic scheme.

In conclusion, the high dropout rate, the increase of returning cases because of relapse or after treatment dropout and increase of MDR TB, require measures to qualifying care to TB patients seeking care at clinics. To control the transmission, the priority would be investment in DOTS implementation, the greater efficiency of short-term schemes, preventing the emergence of resistant forms, and the increasing use of molecular epidemiology in describing micro epidemics, and detecting clusters. Effective control of the epidemic of drug-resistant TB in the study population must aim at reducing both TB transmission and the occurrence of acquired resistance. This study demonstrates that the integration of drug susceptibility testing with genotyping and epidemiological data analysis represents a useful approach to studying the epidemiology of drug-resistant TB.

REFERENCES:

- Asiimwe BB, Ghebremichael S, Kallenius, Koivula GT, and Joloba ML 2008. Mycobacterium tuberculosis spoligotypes and drug susceptibility pattern of isolates from tuberculosis patients in peri-urban Kampala, Uganda. *BMC Infect Dis* 8:101.
- BRASIL, 2007. Ministério da Saúde/Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde 2007. Sistema de vigilância epidemiológica da tuberculose multiresistente. *Rev Bras Pneumol Sanit* 15: 39-46.
- BRASIL, 2008. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1133.
- BRASIL, 2010. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Available from: portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf. Accessed on 11 April 2013.
- BRASIL, 2012. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Volume 43 – Especial Tuberculose março 2012. Available from: <http://www.saude.gov.br/tuberculose>.
- Brito RC, Mello FC, Andrade MK, Oliveira H, Costa W, Matos HJ, Lourenço MC, Rolla VC, Fonseca L, Ruffino Netto A, Kritski AL 2010. Drug-resistant tuberculosis in six hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 14: 24-33.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, et al. 2006. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6(1): 23. doi:10.1186/1471-2180-6-23.
- Cafrune PI, Possuelo LG, Ribeiro AW, Ribeiro MO, Unis G, Jarczewski CA, Rossetti MLR, and Zaha A 2009. Prospective study applying spoligotyping directly to DNA from sputum samples of patients suspected of having tuberculosis. *Can J Microbiol* 55: 895–900.
- Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon MK, Mitchison DA, Rist N, and Smelov NA 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ* 41: 21–43.

- CEVS-RS 2007. Boletim Epidemiológico. Vol 9, No.5. Available from: <http://www1.saude.rs.gov.br/dados/1326721496607v.%209,%20n.%205,%20dez.,%202007.pdf>
- Chien JY, Lai CC, Tan CK, Chien ST, Yu CJ, Hsueh PR 2013. Decline in rates of acquired multidrug-resistant tuberculosis after implementation of the directly observed therapy, short course (DOTS) and DOTS-Plus programmes in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* doi:10.1093/jac/dkt103.
- Coelho AGV, Zamarioli LA, Telles MA, Ferrazoli L, Waldman EA 2012. A study of multidrug-resistant tuberculosis in risk groups in the city of Santos, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 107(6): 760-766.
- Dalcolmo MP, Andrade MK, Picon PD 2007. Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control. *Rev Saude Publica* ;41 Suppl 1:34-42.
- Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MSN, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles M, Ritacco V, Suffys PN, Lopes ML, Campelo CL, Miranda SS, Kremer K, Silva Almeida PE, Fonseca LS, HO JL, Kritski AL, Rossetti MLR 2009. 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* 9:39.
- Maschmann RA, Verza M, Silva MS, Sperhacke RD, Ribeiro MO, Suffys PN, Gomes HG, Tortoli E, Marcelli F, Zaha A, Rossetti MLR 2011. Detection of rifampin-resistant genotypes in *Mycobacterium tuberculosis* by reverse hybridization assay. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106:139-45.
- Maschmann RA, Spies FS, Nunes LS, Ribeiro AW, Machado TRM, Zaha A and Rossetti MLR 2013. Performance of the GenoType MTBDRplus Assay Directly on Sputum Specimens from Brazilian Patients with Tuberculosis Treatment Failure or Relapse *J Clin Microbiol*, 51(5):1606. DOI: 10.1128/JCM.00364-13.
- Vieira R da CA, Fregona G, Palaci M, Dietze R, Maciel ELN 2007. Perfil epidemiológico dos casos de tuberculose multirresistente do Espírito Santo. *Rev Bras Epidemiol* 10: 56-65.
- Farnia P, Masjedi MR, Varahram M, Mirsaeidi M, Ahmadi M, Khazampour M, Tabarsi P, Baghei P, Marjane M, Bahadori M, Zarifi AZ, and Velayati AA 2008. The recent-transmission of *Mycobacterium tuberculosis* strains among Iranian and Afghan relapse cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping. *BMC Infect. Dis.* 8:109.
- Giampaglia CMS, Martins MC, Inumaru VTG, Butuem IV, Telles MAS 2005. Evaluation of a rapid differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with para-nitrobenzoic acid and thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. *Int J Tuberc Lung Dis* 9: 206–209.

- Gomes HM, Elias AR, Oelemann MA, Pereira MA, Montes FF, Marsico AG, Kritski AL, Filho Ldos A, Caldas PC, Possuelo LG, Cafrune P, Rossetti ML, Lucena N, Saad MH, Cavalcanti HR, Leite CQ, de Brito RC, Lopes ML, Lima K, Souza M, Trindade Rde C, Zozio T, Sola C, Rastogi N, Suffys PN 2012. Spoligotypes of Mycobacterium tuberculosis complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect Genet Evol* 12(4):649-56. doi: 10.1016/j.meegid.2011.08.027.
- Ignatova A, Dubiley S, Stepanshina V, and Shemyakin I 2006. Predominance of multi-drug-resistant LAM and Beijing family strains among Mycobacterium tuberculosis isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia. *J Med Microbiol* 55:1413–1418.
- Juan G, Lloret T, Perez C, Lopez P, Navarro R, Ramón M, Cortijo J, Morcillo EJ 2006. Directly observed treatment for tuberculosis in pharmacies compared with self-administered therapy in Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 10(2):215–221.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper, S et al. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35(4): 907–914. PMID:9157152.
- Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC 2003. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrobial Agents Chemother* 47, pp. 3616–361.
- Matos ED, Lemos AC, Bittencourt C, Mesquita CL. 2007. Anti-tuberculosis drug resistance in strains of Mycobacterium tuberculosis isolated from patients in a tertiary hospital in Bahia. *Braz J Infect Dis* 11, 331—338.
- Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC 2005. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 55, pp. 500–505.
- Natal S, Valente JG, Sanchez AR, Penna ML. 2003. Isoniazid and rifampicin resistance and prior treatment for tuberculosis. *Cad. Saude Publica*. 19, 1277—1281.
- Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents Chemother* 46, pp. 2720–2722
- Perizzolo PF, Dalla Costa ER, Ribeiro AW, Spies FS, Ribeiro MO, Dias CF, Unis G, Silva PA, Gomes HM, Suffys PN, Rossetti MLR 2012 Characteristics of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in southern Brazil Tuberculosis 92 :56e59.

- Pinto WP, Hadad DJ, Silva Telles MA, Ueki SY, Palaci M, Basile MA 2001. Tuberculosis and drug resistance among patients seen at an AIDS Reference Center in São Paulo, Brazil. *Int J Infect Dis* 5, 93—100.
- Santos LC, Bousquet HM, Pereira AM, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A 2010. A high prevalence of resistance in new tuberculosis cases of midwestern Brazil. *Infect Genet Evol* 10: 1052-1057
- SMS/POA 2010. Plano Municipal de Saúde 2010- 2013, Prefeitura Municipal de Porto Alegre Secretaria Municipal de Saúde. Available from http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/sms/usu_doc/pms.pdf.
- Telles MAS, Ferrazoli L, Waldman EA, Giampaglia CMS, Martins MC, Ueki SYM, Chimara E, Silva CA, Cruz V, Walkman CCS, Heyn I, Uehara Hirono I, Riley LW 2005. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in an urban community. *Int J Tuberc Lung Dis* 9: 970-976.
- Valcheva V, Mokrousov I, Narvskaya O, Rastogi N, and Markova N. 2008. Molecular snapshot of drug-resistant and drug-susceptible Mycobacterium tuberculosis strains circulating in Bulgaria. *Infect Genet Evol* 8:657–663.
- van Soolingen D, de Hass PE, Hermans PW, van Embden JD. 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* 235:196-205.
- WHO- World Health Organization 2003. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. (WHO/TB/2003.320). Geneva, Switzerland.
- WHO- World Health Organization 2011. Global tuberculosis control report 2011. Available from http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html. accessed on March 06, 2012.
- WHO- World Health Organization 2012a. Global tuberculosis report 2012. available http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf.
- WHO - World Health Organization 2012b. Multidrug-resistant TB (MDR-TB): 2013 Update. Available from http://www.who.int/tb/challenges/mdr/MDR_TB_FactSheet.pdf.

Capítulo IV

Performance of the GenoType MTBDR*plus* Assay Directly on Sputum Specimens from Brazilian Patients with Tuberculosis Treatment Failure or Relapse

Artigo publicado no periódico Journal of Clinical Microbiology.

Performance of the GenoType MTBDR_{plus} Assay Directly on Sputum Specimens from Brazilian Patients with Tuberculosis Treatment Failure or Relapse

Raquel de Abreu Maschmann,^{a,b} Fernanda Sá Spies,^b Luciana de Souza Nunes,^d Andrezza Wolowski Ribeiro,^b Taís Raquel Marcon Machado,^a Arnaldo Zaha,^b Maria Lucia Rosa Rossetti^{a,b,c}

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil^a; Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil^b; Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil^c; Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil^d

Rapid identification of drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* is important in determining treatment for tuberculosis. The aim of this work was evaluate the performance of the GenoType MDRTB_{plus} assay directly on sputum of patients who had treatment failure or relapse in a routine outpatient setting in southern Brazil.

Isoniazid (INH) and rifampin (RIF) are the main first-line drugs used for tuberculosis (TB) treatment. The rapid identification of drug resistance, particularly of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) clinical isolates (defined as strains resistant to at least INH and RIF) is an important challenge to developing rapid and adequate antituberculosis chemotherapy and preventing the spread of resistant strains. The GenoType MTBDR_{plus} assay has been validated in several countries (1, 2, 3, 4) but not yet in Brazil. In the present study, we compared the performance of GenoType MDRTB_{plus} to that of DNA sequencing and conventional drug susceptibility testing (DST) for detecting drug-resistant strains of *M. tuberculosis* directly in sputum specimens from patients who had treatment failure or relapse in a routine setting between August 2009 and June 2011. We enrolled patients >18 years old who were treated at a reference hospital for tuberculosis, in Porto Alegre, the capital of Rio Grande do Sul State in southern Brazil. The incidence of the disease in this city is 112 cases per 100,000 people (5). Culture by Petroff's method and identification were performed according to WHO recommendations (6). After culture, DST was performed using the proportion method on Lowenstein-Jensen medium with the critical concentrations 0.2 µg/ml INH, 40 µg/ml RIF, 4 µg/ml streptomycin (SM), and 2 µg/ml ethambutol (EMB) (7), with a critical proportion of 1% indicating that an isolate is resistant. Samples were analyzed by DNA sequencing of the key regions involved in the development of resistance (*rpoB*, *katG*, and *inhA*) (8, 9). After pretreatment using Petroff's method, the DNA extraction (directly from sputum), PCR amplification, strip hybridization, and interpretation of profiles of MTBDR_{plus} were performed according to the manufacturer's instructions. Statistical analysis was performed using SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL). We deter-

mined the κ scores to assess concordance, and they were interpreted as follows: <0.45 = poor; 0.45 to 0.70 = fair; and >0.70 = excellent. Statistical significance was defined as a *P* value of <0.05.

During the period analyzed, we collected 112 sputum specimens; 68 grew on solid media, and all cultures belonged to the *M. tuberculosis* complex (niacin positive and paranitrobenzoic acid [PNB] negative). Of the 68 isolates analyzed by DST, 33 (48.5%) were MDR (RIF/INH, *n* = 29; RIF/INH/SM, *n* = 4), 18 (26.4%) were mono-resistant (RIF, *n* = 1; INH, *n* = 16; SM, *n* = 1), 5 (7.3%) were poly-resistant (INH/SM), and 12 (17.6%) were sensitive to all four drugs. All 68 positive cultures were sequenced, and 32 (47%) had mutations in the *rpoB* gene. Of these 32 isolates, 19 (59.4%) had the mutation S531L, the most common mutation, consistent with the results of other studies (1, 10), 6 (18.8%) had a 12-nucleotide (CCAGAACAACCC) insertion between codons 516 and 517 (a rare insertion, but in this study the second most frequent), 5 (15.6%) had a mutation in codon 526 (H526D, *n* = 1; H526Y, *n* = 4), and 2 (6.2%) had a double mutation (D516H and H526D). Of 32 samples (47%) with mutations in the *katG* gene, 26 (81.2%) had S315T, 5 (15.6%) had S315N, and one (3.1%) had S315R. The last two mutations are rare and were described in

Received 6 February 2013 Accepted 1 March 2013

Published ahead of print 6 March 2013

Address correspondence to Raquel de Abreu Maschmann, raquel368@gmail.com.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00364-13

TABLE 1 Strains that have no interpretable patterns in GenoType TBMDR_{plus} assay (*n* = 6)

Sputum AFB grade (<i>n</i>) ^a	DST result		Sequence			GenoType MTBDR _{plus} ^b
	RMP	INH	RpoB	KatG	InhA	
+ (1)	R	R	H526Y (CAC-TAC)	S315R (AGC-AGA)	WT	Bands were too faint to be interpreted
+ (2), Neg (1)	R	R	ins in codon 516 CCAGAACAACCC	S315T (AGC-ACC)	WT	Bands were too faint to be interpreted
Neg (1)	R	R	S531L (TCG-TTG)	S315T (AGC-ACC)	WT	Lacked the TUB band
+++ (1)	R	R	S531L (TCG-TTG)	WT	WT	Lacked the TUB band

^a Neg, 0 acid-fast bacilli (AFB)/100 fields; +, 10 to 99 AFB/100 fields; + + +, >10 AFB/20 fields.

^b The TUB band indicates that the sample belongs to the *M. tuberculosis* complex.

TABLE 2 Patterns of results of GenoType MTBDRplus in comparison to DST and sequencing (*n* = 62)

Agreement	No. of samples	DST result ^a		Sequencing result			GenoType MTBDRplus result ^{a,b}		
		RMP	INH	RpoB	KatG	InhA	RpoB	KatG	InhA
Total agreement	13 ^c	S	S	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	11	R	R	S531L (TCG-TTG)	S315T (AGC-ACC)	WT	Δwt8 + Mut3	Mut1 ^e	WT
	8	S	R	WT	S315T (AGC-ACC)	WT	WT	Mut ^d	WT
	3	R	R	H526Y (CAC-TAC)	S315N (AGC-AAC)	WT	Δwt7 + Mut2A ^e	ΔkatGwt	WT
	1	R	S	S531L (TCG-TTG)	WT	WT	Δwt8 + Mut3	WT	WT
	1	S	R	WT	S315N (AGC-AAC)	-15C-T	WT	ΔkatGwt	Mut1 ^e
	1	R	R	Insertion in codon 516 (CCAGAACAACCC)	S315T (AGC-ACC)	WT	Δwt3	Mut1 ^e	WT
	1	R	R	S531L (TCG-TTG)	WT	-15C-T	Δwt8 + Mut3 ^e	WT	Mut1 ^e
	1	S	R	WT	WT	-15C-T	WT	WT	Mut1 ^e
Some disagreement	1	R*	R	WT	S315N (AGC-AAC)	WT	WT	ΔkatGwt	WT
	2	R	R	Insertion in codon 516 (CCAGAACAACCC)	S315T (AGC-ACC)	WT	WT*	Mut1 ^e	WT
	9	S	R*	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	1	S	R*	WT	WT	WT	Δwt8 + Mut3	WT	WT
	1	S*	R*	S531L (TCG-TTG)	WT	WT	Δwt8 + Mut3 ^e	WT	WT
	1	R	R*	H526D (CAC-GAC)	WT	WT	Δwt7 + Mut2B ^e	WT	WT
	3	R	R*	S531L (TCG-TTG)	WT	WT	Δwt8 + Mut3 ^e	WT	WT
	2	R	R*	D516H (GAC-CAC) + H526D (CAC-GAC)	WT	WT	Δwt3, Δwt4, Δwt7, and Mut2B ^e	WT	WT
	2	R*	R*	WT	WT	WT	WT	WT	WT

^a *, discordant result.

^b Δ, absence of hybridization signal with the wild-type probes.

^c One sample was monoresistant to streptomycin.

^d Two strains showed a wild-type and mutation probe-positive hybridization pattern together.

^e Positive hybridization result with the specified mutant probe.

other studies (8, 10, 11, 12). Three samples had a mutation in *inhA* (-15C→T). Based on sequencing of the 68 samples tested, 23 (33.8%) were classified as MDR (Tables 1 and 2). Table 2 shows the results of DST, MTBDRplus, and sequencing of 62 clinical strains; on one occasion, the MTBDRplus results for 4 (6%) samples could not be interpreted. Another two samples were excluded since they were smear negative (Table 1); according to manufacturer's instructions MTBDRplus allows resistance identification of smear-positive samples.

The diagnostic performance of MTBDRplus compared to DST and sequencing is summarized in Table 3. The results of sensitivity and specificity of the MTBDRplus assay in our study (Table 3) were somewhat lower than those in other recent studies, in which the sensitivity of the MTBDRplus assay for detecting RIF and INH resistance ranged from 92% to 99% and from 73% to 92%, respectively (13, 14, 15). We observed in our study that the MTBDRplus assay is more sensitive for detecting RIF resistance than INH resistance (82.0% versus 60.0% using the conventional DST) (Table 3), and the same was observed in some other studies (10, 16, 17). This could be explained by the fact that, for RIF resistance, the mutations in the *rpoB* gene occur in a well-defined region, while for INH resistance, it is well known that about 10% to 25% of INH-

resistant strains are thought to have mutations outside *katG* and *inhA* loci (18). Efflux systems may also play a role in the development of INH resistance (19, 20). Five strains classified as RIF resistant by DST were classified as RIF susceptible using the MTBDRplus assay. The sequencing revealed that three of these strains were *rpoB* wild type, and the other two contained an insertion in codons 516 to 517. This insertion has the same sequence as codons 517 to 520 and may have caused hybridization of the corresponding wild-type probe (wt3). For the three wild-type samples, it is possible that the mutations were located in regions other than the *rpoB* hot spot. In two other samples, the opposite occurred, as they were classified as RIF resistant by the MTBDRplus assay, *rpoB* Δwt8 + Mut3 (S531L), but were classified as RIF susceptible by conventional DST. Sequencing revealed the S531L mutation in one strain but no mutations in the other. This phenomenon may be due to incorrect DST assessment or the presence of strains exhibiting heteroresistance (4, 21). Sequencing revealed that 19 strains classified as INH susceptible by the MTBDRplus assay but INH resistant by DST all had wild-type *katG* and *inhA* genes. This may have occurred because of the presence of mutations in other genes associated with INH resistance or efflux systems (18, 19, 22).

As the MTBDRplus assay shows 100% specificity and positive

TABLE 3 Diagnostic performance of GenoType MTBDRplus in comparison to DST and sequencing^a

Test	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Kappa
DST					
RMP resistance	23/28 (82)	32/34 (94)	23/25 (95.8)	32/37 (86.4)	0.77
INH resistance	29/48 (60)	14/14 (100)	29/29 (100)	14/33 (42)	0.41
MDR-TB ^b	16/27 (59.2)	35/35 (100)	16/16 (100)	35/46 (76.0)	0.62
Sequencing					
RMP resistance	24/26 (92.3)	35/36 (97.2)	24/25 (96)	35/37 (94.6)	0.90
INH resistance	29/29 (100)	33/33 (100)	33/33 (100)	29/29 (100)	1.00
MDR-TB ^b	16/18 (88.9)	44/44 (100)	16/16 (100)	44/46 (95.6)	0.92

^a PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value. Values are number of infected patients/total number of patients (%).

^b Resistant to both INH and RMP.

predictive value for detecting MDR-TB and good sensitivity for detecting RIF resistance directly from sputum, we conclude that this assay will allow prompt identification and treatment of MDR-TB before the results of conventional DST are available. Because there is still some discordance between conventional and molecular DST methods, we recommend that the MTBDR*plus* assay should be used to provide initial guidance on therapy. Due to the small number of samples, further studies are needed to evaluate the impact of introducing the MTBDR*plus* assay on treatment outcomes and the feasibility and cost associated with its widespread implementation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the staff from Hospital Sanatório Partenon for helping during patient recruitment, and the staff from the Laboratory of Bacteriology of Tuberculosis from IPB/LACEN-FEPPS for helping with processing of the samples and culture management.

REFERENCES

- Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. 2008. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 177:787–792.
- Tolani MP, D'souza DTB, Mistry NF. 2012. Drug resistance mutations and heteroresistance detected using the GenoType MTBDR*plus* assay and their implication for treatment outcomes in patients from Mumbai, India. *BMC Infect. Dis.* 12:9.
- Huang WL, Chen HY, Kuo YM, Jou R. 2009. Performance assessment of the GenoType MTBDR*plus* test and DNA sequencing in detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 47:2520–2524.
- Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Simak T, Malomanova N, Fedorin I, Drobniewski F. 2009. Performance of the GenoType[®] MTBDR*plus* assay in the diagnosis of tuberculosis and drug resistance in Samara, Russian Federation. *BMC Clin. Pathol.* 9:2.
- Ott WP, Jarczewski CA. 2007. Combate à tuberculose sob novo enfoque no Rio Grande do sul. *Bol. Epidemiol.* 9:1–8.
- World Health Organization. 2003. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/TB/2003.320. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon MK, Mitchison DA, Rist N, Smelov NA. 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull. World Health Organ.* 41:21–43.
- Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MSN, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles MA, Ritacco V, Suffys PN, Lopes ML, Campelo CL, Miranda SS, Kremer K, da Silva PEA, Fonseca LS, Ho JL, Kritski AL, Rossetti MLR. 2009. Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol.* 9:39.
- Maschmann RA, Verza M, Silva MS, Sperhake RD, Ribeiro MO, Suffys PN, Gomes HG, Tortoli E, Marcelli F, Zaha A, Rossetti MLR. 2011. Detection of rifampin-resistant genotypes in *Mycobacterium tuberculosis* by reverse hybridization assay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106:139–145.
- Jin J, Zhang Y, Fan X, Diao N, Shao L, Wang F, Hu P, Wang S, Weng X, Zhang W. 2012. Evaluation of the GenoType[®] MTBDR*plus* assay and identification of a rare mutation for improving MDR-TB detection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 16:521–526.
- Brossier F, Veziris N, Tuffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. 2006. Performance of the GenoType MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low- and high-level resistance. *J. Clin. Microbiol.* 44:3659–3664.
- Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, Shinnick TM. 2007. Association of specific mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin. Microbiol. Infect.* 13:620–626.
- Hillemann D, Rüsche-Gerdes S, Richter E. 2007. Evaluation of the GenoType MTBDR*plus* assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 45:2635–2640.
- Lacoma A, Garcia-Sierra N, Prat C, Ruiz-Manzano J, Haba L, Rosés S, Maldonado J, Dominguez J. 2008. GenoType MTBDR*plus* assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 46:3660–3667.
- Miotto P, Piana F, Cirillo DM, Migliori GB. 2008. GenoType MTBDR*plus*: a further step toward rapid identification of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 46:393–394.
- Rigouts L, Hoza AS, De Rijk P, Torrea G, Chonde TM, Basra D, Zignol M, van Leth F, Egwaga SM, Van Deun A. 2011. Evaluation of the GenoType[®] MTBDR*plus* assay as a tool for drug resistance surveys. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15:959–965.
- Ling DI, Zwerling AA, Pai M. 2008. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Eur. Respir. J.* 32:1165–1174.
- Zhang Y, Yew WW. 2009. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 13:1320–1330.
- Machado D, Couto I, Perdigão J, Rodrigues L, Portugal I, Baptista P, Veigas B, Amaral L, Viveiros M. 2012. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 7:e34538. doi:10.1371/journal.pone.0034538.
- Viveiros M, Portugal I, Bettencourt R, Victor TC, Jordaan AM, Leandro C, Ordway D, Amaral L. 2002. Isoniazid-induced transient high-level resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2804–2810.
- Van Deun A, Barrera L, Bastian I, Fattorini L, Hoffmann H, Kam KM, Rigouts L, Rüsche-Gerdes S, Wright A. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* Strains with highly discordant rifampin susceptibility test results. *J. Clin. Microbiol.* 47:3501–3506.
- Cardoso RF, Cooksey RC, Glenn P, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite CQF, Sato DN, Shikama ML, Mamizuka EM, Hirata RDC, Hirata MH. 2004. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3373–3381.

Capítulo V

Microplate hybridization assay for detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

Artigo em preparação para ser submetido à publicação no periódico Journal of Clinical Microbiology.

Microplate hybridization assay for detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

Authors: Raquel de Abreu Maschmann¹, Benerson Salgado², Sérgio Luiz Montego Ferreira Júnior², Arnaldo Zaha⁵, Maria Lucia Rosa Rossetti^{2,3}

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS - Porto Alegre, Brazil;

⁵Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT

WHO estimates that there were about 0.5 million of new MDR-TB cases worldwide in 2011. About 60% of these cases occurred in Brazil, China, India, the Russian Federation and South Africa alone. Alarming increases in MDR-TB, the emergence of extensively drug-resistant TB (XDR-TB), potential institutional transmission, and rapid mortality of MDR-TB and XDR-TB patient with HIV co-infection, have highlighted the urgency for rapid screening methods. Conventional methods for mycobacteriological culture and drug susceptibility testing (DST) are slow and cumbersome. The aim of this study was to standardize an assay (Detect-TBMDR), based on reverse hybridization on microwell to detect the most common mutations associated with resistance to rifampin (*rpoB*) and isoniazid (*katG* and *inhA*) in *M. tuberculosis*, directly in sputum specimens and compare the results with DNA sequencing, conventional DST and a commercial molecular line probe assay data. A panel of 51 clinical samples previously characterized was used. To detect RIF and INH-resistance, the Detect-TBMDR assay showed a sensitivity and specificity of 79.3% and 77.0%, and 100% and 65%, respectively, compared to conventional DST. When compared with sequencing, Detect-TBMDR assay, to detect RIF and INH-resistance, showed a sensitivity and specificity of 81.2% and 94.7% and to 100% and 96.2%, respectively. When compared to GenoType® MTBDRplus, Detect-TBMDR showed a sensitivity and specificity of 79.3% and 82% for detecting RIF resistance and 100% and 95.6% for detecting INH resistance. More studies are needed to implement this test in routine laboratory, but the results of Detect-MDRTB were satisfactory, when compared to genotypic tests; the results were more reliable, having

a higher correlation with sequencing, which is a gold standard, than with the commercial kit Genotype MDRTB*plus*.

INTRODUCTION

Despite the efforts made worldwide to reduce the number of cases of tuberculosis (TB), multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) constitutes a public health problem and represents a severe obstacle to the control of TB, particularly in countries in which the prevalence of this disease remains high (1). WHO estimates that there were about 0.5 million of new MDR-TB cases worldwide in 2011. About 60% of these cases occurred in Brazil, China, India, the Russian Federation and South Africa alone (2). Coverage of DST for TB patients remains low and as a result a minority of drug-resistant TB patients are detected and notified. Information remains incomplete. One in five of the estimated MDR-TB cases, among pulmonary TB patients notified in the world in 2011, were reported to have been enrolled on treatment (from about 1 in 9 in 2009). In certain high burden countries, the proportion was much higher (2).

The incidence rate in Brazil was 42.8 cases per 100,000 inhabitants in 2001, and decreased to 36.0 cases per 100,000 inhabitants in 2011, corresponding to a decrease of 15.9% over the last decade. However, in 2010 there were 611 diagnosed cases of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), defined as strains resistant to isoniazid (INH) and rifampin (RIF) at least, compared to 334 in 2001, corresponding to an increase of 82% in less than 10 years (3). Alarming increases in MDR-TB, the emergence of extensively drug-resistant TB (XDR-TB), potential institutional transmission, and rapid mortality of MDR-TB and XDR-TB patient with HIV co-infection, have highlighted the urgency for rapid screening methods (4).

Conventional methods for mycobacteriological culture and drug susceptibility testing (DST) are slow and cumbersome, requiring sequential procedures for isolation of mycobacteria from clinical specimens, identification of *M. tuberculosis* complex, and in vitro testing of strain susceptibility in the presence of anti-TB drugs. During this time patients may be inappropriately treated, drug resistant strains may continue to spread, and amplification of resistance may occur. A novel technology for rapid detection of anti-TB drug resistance has therefore become a priority in TB research and development.

Our group has developed and evaluated methods for detecting mutations in *rpoB* (5) and *katG* genes (6), using membranes, and for diagnosis of tuberculosis using IS6110 as a target in hybridization assays using microwells (7).

The aim of this study was to standardize an assay based on reverse hybridization on microwell to detect the most common mutations associated with resistance to rifampin (*rpoB*) and isoniazid (*katG* and *inhA*) in *M. tuberculosis*.

2. Methods

Samples and DST

In this study we used a panel of 51 clinical samples that were used in a previous study (8). These samples were submitted both to DST, sequencing of the *rpoB*, *katG* and *inhA* genes and analyzed by GenoType® MTBDR_{plus}, a molecular line-probe assay (8). Culture by Petroff's method and identification were performed according to WHO recommendations (9). After culture, DST was performed using the proportion method on Löwenstein-Jensen medium with the critical concentrations 0.2 µg/ml INH, 40 µg/ml RIF, 4 µg/ml streptomycin (SM), and 2 µg/ml ethambutol (EMB) (10), with a critical proportion of 1% indicating that an isolate is resistant.

PCR amplification

The DNA, extracted directly from sputum, used in PCR amplification for Detect-TBMDR, was the same used for the commercial molecular line-probe assay. The fragments of the *rpoB*, *katG* and *inhA* genes (5; 11) and insertion sequence (*IS*) 6110 were amplified using the primers RF1 (5'-GGTCGCCGCGATCAAGGAGT-3') and RF2 (5'-TGCACGTCGCGGACCTCCA-3'), *katG*1 (5'-CATGAACGACGTCGAAACAG-3') and *katG*2 (5'-Bio-CGAGGAAAC TGTTGTCCCAT -3') and *inhA*1 (5'-CCTCGCTGCCAGAAAGGGA-3') and *inhA*2 (5'-Bio-ATCCCCCGGTTTCCTCCGGT-3') (5; 11), and INS1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3') and INS2 (5'-Bio-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3') (7), respectively. The reverse primers were biotin-labeled and the PCR-multiplex was standardized in a final volume of 75 µL containing 200 µM each of dNTP, 10 mM Tris-HCL (pH 8), 50 mM KCL, 2 mM MgCl₂, 20 pmoles of each primer (RF1/RF2, *katG*1/*katG*2, *inhA*1/*inhA*2 and INS1/INS2), 25 µL of processed sputum and 4.0 U of *Taq* DNA polymerase (invitrogen/USA). The PCR reactions were carried out as follows: 3 min at 95°C; 40

cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 60°C, 1.5 min at 72°C; and 4 min at 72°C. Two control reactions were used for PCR: positive control (*M. tuberculosis* H37Rv DNA, 100 ng) and a negative control (without DNA). PCR products were analyzed on polyacrylamide gel electrophoresis.

Detect-TBMDR assay

Twelve probes were designed using the Software Primer express v2.0 (Applied Biosystems), one to detect *M. tuberculosis* complex, complementary to an internal sequence of the IS6110, seven *rpoB* probes to screen the most common genotypes, five wild type, including the sequence from codon 509 to 534, and two with the sequence showing the most frequent mutations in *rpoB* gene. Two *katG* probes, one with a wild type genotype and one with mutation in codon 315 (AGC-ACC) and two *inhA* probes, one with a wild type genotype and one with mutation in -15 (C-T). All the oligonucleotide probes were designed with a 5'-terminal amino group, to bind to the microwell plates (Nunc Immobilizer™ Amino Surface, Nunc A/S, Roskilde, Denmark). The oligonucleotide sequences are listed in Table 1. Microwell plates were prepared for detection according to manufacturer's instructions. The oligonucleotides were diluted to the appropriate concentration (Table 1) in 0.1 M Na₂CO₃ (pH 9.6). Then 100 µL of each oligonucleotide probe, were added into the wells, sealed with an adhesive cover (HotSeal, Diversified Biotech, Boston, USA) and incubated overnight at 2-8°C. The microplate was then washed three times with phosphate buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 3 mM Na₂HPO₄ and 10 mM KH₂PO₄, pH 7.4) containing 0.05% Tween-20 (Nunc Immobilizer™ Amino Instruction Protocol, 2005). The microwell hybridization protocol, described below, was adapted from Michelon *et al.* (2011). One hundred µL of hybridization solution (5x SSC, 0.5% bovine serum albumin, 0.1% Tween-20) and 5 µL of denatured PCR product was added into 12 wells corresponding to the 12 oligonucleotides and the hybridization was achieved by incubating at 55°C for 45 min. After hybridization, the microplates were washed in 0.5x SSC (2.9 M NaCl and 0.3 M C₆H₅Na₃O₇·2 H₂O) containing 0.1% Tween-20 three times at RT, soaked for 15 min with the same solution pre-heated to 50°C and then washed three more times at room temperature. One hundred microliters of 0.1 M 4-morpholinepropanesulfonic acid buffer [400 ng/mL of streptavidin-peroxidase polymer (Sigma – Cat n° S2438-250U), 30 mg/mL of bovine serum albumin (fraction V), 20 mg/mL of mannitol, 60 mg/mL of

saccharose, 1 mM CaCl₂ and 0.2 mg/mL of thimerosal, pH 7.4] was added to each well and then the plates were incubated for 30 min at 37°C. After, the unbound conjugate was removed washing the wells three times with a Tris-buffered saline solution (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20), soaked for 5 min and then washed three more times with the same solution. One hundred microliters of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Moss, Pasadena, USA) was added and incubated for 15 min at RT. The reaction was stopped with 100 µL of 1 M H₂SO₄. The absorbance value of the reaction mixture at 450 nm was determined using a microplate reader. The whole procedure was also performed for the positive and negative controls.

Determination of specificity of Detect-TBMDR

To determine the specificity of Detect-TBMDR, 100 ng of genomic DNA from *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* (obtained from IPB/LACEN-RS), *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium sherrise*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* (obtained from FIOCRUZ, Brazil) were submitted to the entire procedure.

Cut-off determination

A pool of 95 pulmonary samples, TB-negative according to the gold standard, was used to determine the cut-off value of the reverse-hybridization assay. Samples with a grey zone reading were excluded from subsequent analysis.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The main outcome measures were the performance characteristics of the Detect-TBMDR assay, which included overall agreement between the experimental and the reference tests, sensitivity, specificity, negative and positive predictive values [NPV and PPV] for RIF and INH resistance. Performance characteristics were compared with the phenotypical DST, sequencing method and commercial molecular line probe assay, GenoType® MTBDR_{plus}. We determined the κ scores to assess concordance, which were interpretations as follow: <0.45 = poor, 0.45–0.70 = fair, and >0.70 = excellent.

Table 1. Probe set for identification of the wild type (WT) and mutant genotypes used to prepare the Detect-TBMDR assay.

Oligos	Sequence (5'- 3')	Size	Type	Concentration (pmol/μl)	Cut – off (OD)
Rif1wt	CAGCCAGCTGAGCCAATTCAT	21	WT	0.005	0,450
Rif2wt	TTCATGGACCAGAACAACCC	20	WT	0.15	0,250
Rif3wt	CGCTGTCGGGGTTGACC	17	WT	1.5	0,250
Rif4wt	TTGACCCACAAGCGCCGACT	20	WT	0.03	0,400
Rif5wt	CGACTGTCGGCCGGCTG	17	WT	2.0	0,100
Rif4M	GGTTGACCGACAAGCGCC	18	Mutant	0.05	0,150
Rif5M	GACTGTTGGCGCTGGGC	17	Mutant	1.0	0,100
IS6110	GCCCGTCCC GCCGATCTC	18	WT	1.0	0,250
katGwt	TCACCAGCGGCATCGAG	17	WT	0.02	0,300
katGM	TCACCACCGGCATCGAG	17	Mutant	0.1	0,300
inhAwt	CGGCGAGACGATAGGTTGTC	20	WT	0.02	0,400
inhAM	CGGCGAGATGATAGGTTGTC	20	Mutant	0.005	0,500

OD: optical density

Results

Of the 51 isolates, only two were smear-negative. The sputum positivity of the specimens was: two samples 1-9 AFB/100 fields, 15 samples 1+, 18 samples 2+ and 16 samples 3+. All cultures included in the study belong to *M. tuberculosis* complex (niacin positive and PNB negative). The cut-off value of the assay of each oligonucleotide was defined as the mean optical density plus three times the standard deviation value, resulting in the values described in Table 1. The grey zone was defined as the values between 90% of the cut-off value and 10% above the cut-off value. Table 2 shows the results of Detect-TBMDR, DST, MTBDRplus, and sequencing of clinical strains.

Concordance Between the Conventional DST and the Detect-TBMDR

Concordance was assessed in 51 samples. When compared with the conventional DST, Detect-TBMDR assay correctly identified 17/22 (77.3%) RIF-resistant strains, 26/40 (65%) INH-resistant strains, 17/22 (77.3%) MDR-TB strains, 23/29 (79.3%) RIF-susceptible strains, and 11/11 (100%) INH-susceptible strains (Table 3). Five samples were classified by the Detect-TBMDR assay as RIF-susceptible but were defined as resistant by the DST. Six other samples were classified by Detect-TBMDR assay as RIF-resistant, four of these samples did not hybridized in RIF5, one did not

hybridized in RIF1 and one did not hybridized in RIF2, but were classified as susceptible by the DST. Of 14 samples that were classified by the Detect-TBMDR assay as INH-susceptible but INH-resistant by the DST, 11 were INH-monoresistant, and 3 were MDR. The diagnostic performance of Detect-TBMDR assay compared to DST is summarized in Table 3.

Concordance Between the Sequencing and the Detect-TBMDR

Concordance was assessed in 51 samples. When compared with sequencing data, the Detect-TBMDR assay correctly identified 18/20 (90.0%) strains with a mutation in the *rpoB* hotspot region and 26/31 (83.9%) strains with wild-type *rpoB*. For INH-resistance, the assay correctly identified 25/26 (96.2%) of strains with mutations in the *katG* and *inhA* genes, and all of the strains with wild-type genes. One sample that had the mutation in -15 (C-T) *inhA* gene by sequencing was not correctly identified by Detect-TBMDR assay. In two samples, the Detect-TBMDR assay revealed the presence of strains that were both resistant and susceptible to INH (weak *katG* wild-type with strong *katG* MUT1 mutation-specific bands). In three strains with *katG* 315 AGC→AAC, the mutations were detected by the omission of the corresponding wild type specific probe (Table 1). Two samples were classified by the Detect-TBMDR assay as RIF-susceptible but sequencing revealed the mutation 526 CAC→TAC. In another five sample that was classified by Detect-TBMDR assay as RIF-resistant, three samples did not hybridized in RIF5, one did not hybridized in RIF1 and one did not hybridized in RIF2, the sequencing revealed the absence of a mutation in the hotspot region (Table 2). By analyzing the combined mutations, Detect-TBMDR assay correctly identified 15/17 (88.2%) MDR-TB samples. The diagnostic performance of Detect-TBMDR assay compared to sequencing is summarized in Table 2.

Concordance Between the GenoType® MTBDRplus assay and the Detect-TBMDR.

The GenoType® MTBDRplus assay was performed in 49 samples; however, concordance was assessed in 46 samples, because in three samples the bands were too faint to be interpreted (Table 2). When compared with GenoType® MTBDRplus assay, the Detect-TBMDR assay correctly identified 14/17 (82.4%) strains with a mutation in the *rpoB* hotspot region and 23/29 (79.3%) strains with wild-type *rpoB*.

For INH-resistance, the assay correctly identified 22/23 (95.6%) of strains with mutations in the *katG* and *inhA* genes, and all of the strains with wild-type genes.

Three samples were classified by Detect-TBMDR assay as RIF-susceptible, but GenoType® MTBDRplus revealed in two samples an interpretation that corresponds to rpoB526 (CAC→TAC) mutation, and in one sample an interpretation that corresponds to rpoB531 (TCG→TTG). Five samples were classified by GenoType® MTBDRplus as RIF-susceptible, but Detect-TBMDR assay showed, in three samples, no hybridization signal at RIF5 probe, in one no hybridization signal at RIF1 probe, and in another no hybridization signal at RIF2 probe. By analyzing the combined mutations, Detect-TBMDR assay correctly identified 9/12 (75.0%) MDR-TB samples. One sample that had the mutation in -15 (C-T) *inhA* gene by GenoType® MTBDRplus was not correctly identified by Detect-TBMDR assay. The diagnostic performance of Detect-TBMDR assay compared to GenoType® MTBDRplus assay is summarized in Table 2.

Analytical specificity of Detect-TBMDR

Only the strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, hybridized with the IS6110 probe. Some strains of *M. Avium*, *M. abscessus* and *M. massiliense* hybridized weakly to probes Rif2 and Rif4. However, these results are disregarded because there was no hybridization to the IS6110 probe, so these samples were not considered strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Table 2: Correlation between Detect-TBMDR in comparison to DST, sequencing and GenoType® MTBDRplus

Agreement	No. of samples	Detect-MDRTB result			Sequencing result			DST result		GenoType MTBDRplus result		
		rpoB	katG	inhA	rpoB	katG	inhA	RIF	INH	rpoB	katG	inhA
Total agreement	8	WT	WT	WT	WT	WT	WT	S	S	WT	WT	WT
	5	WT	S315T (AGC-ACC)	WT	WT	S315T (AGC-ACC)	WT	S	R	WT	Mut1	WT
	8	S531L (TCG-TTG)	S315T (AGC-ACC)	WT	S531L (TCG-TTG)	S315T (AGC-ACC)	WT	R	R	Δwt8+Mut3	Mut1	WT
	1	ΔRIF4	Δ315	WT	H526Y (CAC-TAC)	S315N (AGC-AAC)	WT	R	R	Δwt7+mut2A	ΔkatGwt	WT
	1	531 TCG-TTG	WT	(C-T) -15	S531L (TCG-TTG)	WT	(C-T) -15	R	R	Δwt8+Mut3	WT	Mut1
	1	WT	WT	WT	WT	WT	WT	S	S	Bands were too faint to be interpreted		
	2	ΔRIF1 and ΔRIF3	S315T (AGC-ACC)	WT	codon 516 GCCAGAACAACCC	S315T (AGC-ACC)	WT	R	R	Bands were too faint to be interpreted		
Some disagreement	1	H526Y (CAC-TAC)	Δ315	WT	H526Y (CAC-TAC)	S315R (AGC-AGA)	WT	R	R	Bands were too faint to be interpreted		
	7	WT	WT	WT	WT	WT	WT	S	R*	WT	WT	WT
	1	WT	WT	WT	WT	WT	(C-T) -15*	S	R*	WT	WT	Mut1*
	1	WT	WT	WT	WT	WT	WT	R*	R*	WT	WT	WT
	1	WT	Δ315	WT	WT	S315N (AGC-AAC)	WT	R*	R	WT	ΔkatGwt	WT
	1	WT	S315T (AGC-ACC)	WT	WT	S315T (AGC-ACC)	WT	R*	R	Bands were too faint to be interpreted		
	2	WT	Δ315	WT	H526Y (CAC-TAC)*	S315N (AGC-AAC)	WT	R*	R	Δwt7+mut2A*	ΔkatGwt	WT
	1	WT	S315T (AGC-ACC)	WT	S531L (TCG-TTG)*	S315T (AGC-ACC)	WT	R*	R	Δwt8+Mut3*	Mut1	WT
	1	ΔRIF5	WT	WT	WT*	WT	WT	S*	R*	WT*	WT	WT
	1	ΔRIF5 + RIF5R	WT	WT	WT*	WT	WT	S*	R*	Δwt8+Mut3	WT	WT
	1	ΔRIF5	WT	WT	WT*	WT	WT	S*	S	WT*	WT	WT
	1	ΔRIF1	WT	WT	WT*	WT	WT	S*	S	WT*	WT	WT
	1	ΔRIF2	S315T (AGC-ACC)	WT	WT*	S315T (AGC-ACC)	WT	S*	R	WT*	Mut1	WT
	1	ΔRIF5	S315T (AGC-ACC)	WT	WT*	S315T (AGC-ACC)	WT	S*	R	WT*	Mut1	WT
	1	ΔRIF1 and ΔRIF3	S315T (AGC-ACC)	WT	codon 516 GCCAGAACAACCC	S315T (AGC-ACC)	WT	R	R	WT*	Mut1	WT
	2	S531L (TCG-TTG)	WT	WT	S531L (TCG-TTG)	WT	WT	R	R*	Δwt8+Mut3	WT	WT
1	S531L (TCG-TTG)	WT	WT	S531L (TCG-TTG)	WT	WT	S*	R*	Δwt8+Mut3	WT	WT	

Table 3. Diagnostic performance of Detect-TBMDR in comparison to DST, sequencing and GenoType® MTBDRplus.

Test	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	kappa
DST					
RIF-resistance	23/29 (79.3)	17/22 (77.0)	23/28 (82.1)	17/23 (73.9)	0.563
INH-resistance	11/11 (100)	26/40 (65.0)	11/24 (45.8)	26/26 (100)	0.445
MDR-TB ^b	17/22 (77.3)	29/29 (100)	17/17 (100)	29/34 (85.3)	0.795
Sequencing					
RIF-resistance	26/32 (81.2)	18/19 (94.7)	26/28 (92.9)	18/23 (78.3)	0.721
INH-resistance	24/24 (100)	25/26 (96.2)	24/25 (96.0)	25/25 (100)	0.961
MDR-TB ^b	15/17 (88.2)	34/34 (100)	15/15 (100)	34/36 (94.4)	0.909
MTBDRplus					
RIF-resistance	23/29 (79.3)	14/17 (82)	24/27 (88.9)	14/20 (70.3)	0.595
INH-resistance	23/23 (100)	22/23 (95.6)	23/24 (95.8)	22/22 (100)	0.957
MDR-TB ^b	9/12 (75.0)	32/34 (94.1)	9/11 (81.8)	32/35 (91.4)	0.710

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value. Values are number of infected patients/total number of patients (%). MDR-TB: Resistant to both INH and RIF.

DISCUSSION

The early identification of drug resistance would not only help to optimize the treatment of MDR-TB but also to break the chains of transmission (12).

We used the conventional DST, DNA sequencing and GenoType® MTBDRplus assay, to analyze the diagnostic performance of the Detect-TBMDR assay. MTBDRplus is a commercial assay, which also aims to detect mutations in the same gene targets of the method described and standardized in this work. The specimens were processed directly from sputum specimens, as the overall time from receiving the specimen to reporting susceptibility is just 2–3 days as compared with several weeks or months, when using traditional culture-based assays.

To detect RIF-resistance, the Detect-TBMDR assay showed a sensitivity and specificity of 79.3% and 77.0%, respectively, relative to the conventional DST. However, to detect INH-resistance, the sensitivity and specificity of the Detect-TBMDR assay were 100% and 65%, respectively, relative to the conventional DST. When compared to sequencing, Detect-TBMDR assay showed a sensitivity and specificity of 81.2% and 94.7% to detect RIF-resistance, and a sensitivity and specificity of 100% and 96.2%, respectively, to detect INH-resistance. When comparing Detect-TBMDR with GenoType® MTBDRplus, the results were slightly worse than when compared to sequencing. Thus, our test showed a highest correlation with the gold standard.

In our study, six strains were classified as RIF-resistant by Detect-TBMDR

assay but were classified as RIF-susceptible by DST. In four of these samples, by the Detect-TBMDR, there were no hybridization with the probe RIF5, but in one of these there was hybridization with the probe RIF5R, in the other two there were no hybridization with the probe RIF2 and with the probe RIF1. From these six samples, by sequencing, five samples were considered WT by GenoType® MTBDR_{plus}, and one sample showed a mutation S531N (Δ wt8 + Mut3) by sequencing and GenoType® MTBDR_{plus} (Table 2). Therefore, probably, for the sample that was confirmed by GenoType® MTBDR_{plus} probably this phenomenon may be due to incorrect DST assessment that might occur at any laboratory (13), or the presence of strains exhibiting heteroresistance (14) and for the other samples may have been a failure to hybridize with the wild-type (WT) probes.

Five samples were classified as RIF-susceptible by Detect-TBMDR assay but were classified as RIF-resistant by DST, three of these samples were WT, and the other two had the mutation H526Y (CAC→TAC) and S531L (TCG→TTG) by sequencing and GenoType® MTBDR_{plus}. In the three samples classified as RIF-resistant by DST and WT by sequencing, the mutations can be outside the detection range or in some cases no mutation exists in the hot-spot region of the *rpoB* gene even though the isolate is resistant to the RIF. One sample that did not hybridized with the probe RIF1 and RIF3 in Detect-TBMDR, showed an insertion of 12 nucleotides at codon 516 by sequencing, and was resistant by DST, however did not show any mutation in *rpoB* gene by GenoType® MTBDR_{plus}. Detect-MDRTB test did not identify the mutation, but identified the absence of hybridization to the WT probes (RIF1 and RIF3).

Fourteen samples were classified as INH-susceptible by Detect-TBMDR assay but were classified as INH-resistant by DST. From these, thirteen samples did not show any mutation in *katG* and *inhA* genes by sequencing and GenoType® MTBDR_{plus}, agreeing with the mutation detection made in Detect-TBMDR assay. However, one sample had a mutation *inhA* -15 (C-T) that Detect-TBMDR assay failed to detect.

Other studies also described and tested new methodologies to detect clinical mutation. One study, that developed a microwell hybridization assay for detection of RIF resistance in *M. tuberculosis*, all nine resistant samples were correctly identified by the method; however, the number of the samples was too small (15). Han, *et al.* (2009) developed a microwell hybridization assay for detection of isoniazid resistance

in *M. tuberculosis*, the overall sensitivity and specificity of the microwell hybridization assay were 74% based on the conventional method and 100% based on the sequence analysis. These results were similar to the results found in our study.

Despite of all, more studies are needed to implement this test in routine laboratory, although the results of Detect-MDR-TB were satisfactory, when compared to the genotypic tests; the results were more reliable, having a higher correlation with sequencing, which is a gold standard, than with the commercial kit Genotype MDR-TB*plus*. However when compared with phenotypic diagnosis, the correlation results were not so significant (Table 3). This is due to the large number of strains resistant to INH, by DST method, which did not show mutations in the genes surveyed and some strains resistant to RIF, by DST method, which not showed mutations in the studied region of the *rpoB* gene.

The Detect-TBMDR assay can rapidly detect the presence of point mutations within the 81-bp of the *rpoB* gene, the most common mutation in *katG* and *inhA* gene and can identify the organism as a member of the *M. tuberculosis* complex. The microplate hybridization assay has several advantages compared to conventional oligonucleotide hybridization assays. Firstly, the assay is easy to perform and interpret, and it utilizes multipurpose equipment that is available in any basic molecular biology laboratory and could therefore be performed in routine clinical microbiology laboratories.

Apart from the impact on morbidity, mortality and transmission of MDR-TB, introduction of these assays in screening could significantly reduce the need for sophisticated and costly conventional laboratory infrastructure, still vastly inadequate in most high-burden countries.

REFERENCES:

1. **Nathanson E, Lambregts-van Weezenbeek C, Rich ML, et al.** 2006. Multidrug-resistant tuberculosis management in resource-limited settings. *Emerg Infect Dis.*;12:1389–97
2. **World Health Organization.** 2013. Multidrug-resistant TB (MDR-TB): 2013 Update. Disponível em: <http://www.who.int/tb/challenges/mdr/en/>
3. **SVS/MS.** 2012. Boletim epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – Brasil. 2012. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bolepi_v43_especial_tb_correto.pdf
4. **World Health Organization.** 2008. Molecular Line Probe Assays for Rapid Screening of Patients at Risk of Multi-Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB). Disponível em: http://www.who.int/tb/features_archive/expert_group_report_june08.pdf
5. **Maschmann RA, Verza M, Silva MS, Sperhacke RD, Ribeiro MO, Suffys PN, Gomes HG, Tortoli E, Marcelli F, Zaha A, Rossetti MLR.** 2011. Detection of rifampin-resistant genotypes in *Mycobacterium tuberculosis* by reverse hybridization assay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **106**:139–145.
6. **Verza M, Maschmann R de A, Silva MSN, Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Rosso F, Suffys PN, Tortoli E, Marcelli F, Zaha A, Rossetti MLR.** 2009. In house colorimetric reverse hybridisation assay for detection of the mutation most frequently associated with resistance to isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **104**: 710-714.
7. **Michelon CT, Rosso F, Schmid KB, Sperhacke RD, Oliveira MM, Kritski AL, Jr LR, Regina E, Costa D, Ribeiro AW, Verza M, Cafrune PI, Susana M, Silva N, Kuhleis D, Zaha A, Rossetti MLR.** 2011. Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **106**:194-199.
8. **Maschmann RA, Spies FS, Nunes LS, Ribeiro AW, Machado TRM, Zaha A, Rossetti MLR.** 2013. Performance of the GenoType MTBDRplus Assay Directly on Sputum Specimens from Brazilian Patients with Tuberculosis Treatment Failure or Relapse. *J. Clin. Microbiol.* **51**:1606–1608
9. **World Health Organization.** 2003. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/TB/2003.320. World Health Organ. Geneva, Switzerland.
10. **Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon MK, Mitchison DA, Rist N, Smelov NA.** 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull. World Health Organ.* **41**:21– 43.
11. **Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MSN, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune**

PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles MA, Ritacco V, Suffys PN, Lopes ML, Campelo CL, Miranda SS, Kremer K, da Silva PEA, Fonseca LS, Ho JL, Kritski AL, Rossetti MLR. 2009. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol.* **9**:39. 9.

12. **Suresh N, Singh UB, Gupta C, Arora J, Rana T, Samantaray JC.** 2007. Rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from stained sputum smears using single-tube nested polymerase chain reaction deoxyribonucleic acid sequencing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **58**(2), 217–22. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.01.007

13. **Van Deun A, Barrera L, Bastian I, Fattorini L, Hoffmann H, Kam KM, Rigouts L, Rüsç-Gerdes S, Wright A.** 2009. *Mycobacterium tuberculosis* Strains with Highly Discordant Rifampin Susceptibility Test Results. *J. Clin. Microbiol.* **47** (11)3501–3506 doi:10.1128/JCM.01209-09

14. **Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Simak T, Malomanova N, Fedorin I, Drobniewski F.** 2009. Performance of the Genotype® MTBDRplus assay in the diagnosis of tuberculosis and drug resistance in Samara, Russian Federation. *BMC Clin. Pathol.* **9**:2. doi: 10.1186/1472-6890-9-2.

15. **Garcia L, Alonso-Sanz M, Rebollo MJ, Tercero JC, Chaves F.** 2001. Mutations in the *rpoB* Gene of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Spain and Their Rapid Detection by PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent. Assay. *J. Clin. Microbiol.*, **39** (5)1813–1818.

16. **Han HE, Lee IS, Hwang JH, Bang HE, Kim Y, Cho SN, Kim TU, Lee HY.** 2009. Microplate hybridization assay for detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMB Rep.* **42**(2):81-5.

Capítulo VI

Discussão Geral e Perspectivas

6.1 Discussão Geral:

A TB continua sendo um problema de saúde importante mundialmente, exigindo o desenvolvimento de estratégias para o seu controle, considerando aspectos humanitários, econômicos e de saúde pública. O método mais comum para o diagnóstico de TB no mundo é baciloscopia (desenvolvido mais de 100 anos atrás), em que as bactérias são observadas em amostras de escarro examinadas sob um microscópio. Em países com capacidade laboratorial mais desenvolvidas, os casos de TB também pode ser diagnosticados através de métodos de cultura ou, cada vez mais, através de testes moleculares rápidos.

A taxa de incidência de TB no Brasil, em 2001, foi de 42,8 casos para cada grupo de 100 mil habitantes e caiu para 36,0 no ano de 2011, o que significa uma queda de 15,9 pontos percentuais na última década. No ano de 2010, foram diagnosticados 611 casos de TB MDR, comparados a 334, em 2001, um crescimento de 82% entre os anos analisados. De 2009 para 2010 o crescimento foi bem expressivo: 48% a mais de casos diagnosticados. Os casos de retratamento (recidiva e reingresso após abandono) são os que apresentam maior probabilidade de evoluir para um desfecho desfavorável, pois já realizaram o tratamento por tempo superior a 30 dias e podem selecionar cepas que apresentem resistência a algum medicamento (BRASIL, 2012). Com isso a OMS tem indicado o fortalecimento da rede de laboratórios e o desenvolvimento de novos testes diagnósticos, que são urgentemente necessários, para qualificar a cobertura do diagnóstico da TB e MDR-TB (WHO, 2011).

É importante reconhecer os fatores individuais e coletivos responsável pela distribuição heterogênea global de resistência ao medicamento, e para identificar as populações em maior risco, a fim de ser capaz de desenvolver o processo mais apropriado e encontrar as melhores estratégias. O diagnóstico e tratamento adequado da TB-MDR permanecem como grandes desafios. Um dos maiores desafios nos dias de hoje, para o controle da TB no Brasil, são os casos de retratamento. Esse grupo, formado pelos casos de recidiva e reingressos após abandono, apresenta chance maior de desenvolver um desfecho desfavorável para a doença como óbito, abandono e multirresistência às drogas de tratamento para a TB (BRASIL, 2010).

Para o tratamento desses casos, é necessário o uso de medicamentos injetáveis e de fármacos de reserva, com duração de 18 a 24 meses, cuja efetividade é de aproximadamente 60%. O problema do abandono persistente do tratamento da TB

sensível ou resistente merece ser mais bem avaliado, e deve envolver profissionais de saúde (incluindo a saúde mental), sociedade civil, profissionais do Judiciário e outros setores do Governo, principalmente porque abandonos sucessivos e/ou recusas reiteradas em submeter-se aos tratamentos preconizados podem levar ao desenvolvimento de bacilos extensivamente resistentes. A associação com uso de drogas ilícitas e alcoolismo muitas vezes está presente. Estratégias diferenciadas devem ser adotadas, visto que os pacientes colocam em risco a saúde dos seus contatos e da sociedade pela transmissão desses bacilos, que poderão causar uma doença praticamente incurável, até que novos medicamentos sejam disponibilizados. (Brasil, 2011).

Um dos objetivos desse estudo foi identificar o perfil dos pacientes que procuraram atendimento no ambulatório do Hospital Sanatório Partenon e que possuíam maior probabilidade de ter TB-MDR. Durante os dois anos em que os dados e amostras dos pacientes foram coletadas, pudemos observar que a maioria destes tinham um perfil refratário ao tratamento. Não por acaso, muitos pacientes estavam em retratamento por ter abandonado um tratamento anterior. Muitos deles devido à tomada irregular da medicação, devido à problemas sociais, uso de drogas lícitas e ilícitas ou sensação de curado e que não precisariam completar o tratamento.

Os nossos resultados sugerem que o número de episódios de tratamento prévio, bem como a não aderência dos tratamentos podem ser importantes na determinação da probabilidade de TB-MDR nos pacientes pesquisados. Isso corrobora com outros estudos realizados no Brasil (COELHO *et al.*, 2012; TELLES *et al.*, 2005). Podemos verificar, apesar de não ser estatisticamente significativa, uma tendência nos valores relacionados a tratamento prévio, onde 25% dos pacientes que possuíam TB-MDR não haviam realizado tratamento antes, demonstrando, provavelmente uma demora no diagnóstico ou um controle ineficaz dos pacientes MDR, estando transmitindo TB-MDR para pacientes virgens de tratamento.

No grupo estudado, encontramos uma relação estatisticamente significatnte em ser do sexo masculino e a maior probabilidade em ter MDR-TB. Outro dado importante e estatisticamente significativa foi a relação entre no tempo dos sintomas antes de procurar atendimento e a maior probabilidade em ter TB resistente a qualquer droga ou MDR-TB, mostrando que uma parcela muito maior nos grupos resistente a qualquer droga e MDR demoravam mais de 30 dias para procurar atendimento médico. Este dado vem reforçar o número aumentado de pacientes MDR que não

havia realizado tratamento anteriormente, provavelmente tendo estes se contaminado com pacientes MDR que demoraram a procurar atendimento médico. Durante um ano, um indivíduo com a forma pulmonar bacilífera poderá infectar, em média, de 10 a 15 pessoas, quanto maior a intensidade da tosse e a concentração de bacilos no ambiente e, quanto menor a ventilação do mesmo ambiente, maior será a probabilidade de infectar os circunstantes

Encontramos um número expressivo de amostras INH mono-resistentes em nosso estudo, talvez devido à busca ativa de pacientes com falha do tratamento. Existem alguns testes comerciais como INNO-LIPA Rif TB e Xpert® MTB/RIF com base apenas na identificação de mutações que conferem resistência à RIF, que podem não ser adequados para o diagnóstico precoce desses pacientes com um perfil da INH mono-resistência. Em vários casos também não foram encontradas mutações nos principais genes que conferem resistência à INH, sendo então, necessário o uso de testes fenotípicos.

Alguns estudos anteriores encontraram associação entre superfamílias de spoligotipos e resistência às drogas, mostrando que as famílias Beijing, LAM e Haarlem foram associados com resistência às drogas anti-TB (FARNIA *et al.*, 200; IGNATOVA *et al.*, 2006) e alguns não encontraram associação entre superfamílias spoligotipo e resistência às drogas (ASIIMWE *et al.*, 2008, VALCHEVA *et al.*, 2018). Em nosso estudo não encontramos nenhuma associação estatisticamente significativa entre spoligotipos e resistência às drogas, no entanto, três grupos, U (SIT-863), LAM6 (SIT-64) e Unk1, possuíam apenas isolados MDR-TB. Curiosamente, todos os pacientes que tinham a cepa pertencente ao cluster U (SIT-863), que apresentou um número maior de amostras dentre os isolados MDR, estavam encarcerados ou eram contato de pacientes encarcerados. Todas as amostras do cluster U (SIT-863) possuíam a inserção de 12 nucleotídeos (CCAGAACAACCC), provavelmente indicando uma transmissão dentro dos presídios, pois este spoligotipo não é muito comumente encontrado no Brasil tendo sido relatado em três estudos no Brasil (BRUDEY *et al.*, 2006). Em outro estudo realizado no mesmo hospital, as amostras com o mesmo padrão de spoligotipo foram descritas e todos os pacientes também possuíam história de encarceramento (CAFRUNI *et al.*, 2009).

A frequência de cepas resistentes encontradas neste trabalho refletem uma parte da realidade enfrentada no nosso meio, tendo em conta que estas proporções muitas vezes são subestimadas, a pesquisa de resistência aos medicamentos na TB

deve ser uma prioridade e necessitará de estratégias concebidas especificamente para áreas de TB hiperendêmica. Uma das estratégias para controlar a transmissão, seria o investimento na implementação do DOTS (*Direct Observed Treatment Strategy, Short-Course* – Tratamento Diretamente Observado, em português), a maior eficiência dos sistemas de curto prazo, evitando o surgimento de formas resistentes eo uso crescente da epidemiologia molecular na descrição de micro epidemias para detectar clusters. O controle efetivo da epidemia de tTB resistente a medicamentos na população do estudo deve ter como objetivo reduzir tanto a transmissão da doença quanto a ocorrência de resistência adquirida.

A identificação precoce da resistência às drogas pode não apenas ajudar a otimizar o tratamento da MDR-TB, mas também interromper a cadeia de transmissão e contribuir para a redução do custo total do tratamento.

Nesse estudo, foram utilizados o TSA convencional (método das proporções) e sequenciamento de DNA como testes padrão-ouro para analisar o desempenho do teste comercial GenoType® MTBDR*plus* e as três metodologias anteriores para analisar o teste “*in house*” Detect-TBMDR, descrito e padronizado no presente estudo. Este estudo avaliou o desempenho do teste comercial e “*in house*” em uma região geográfica endêmica para *M. tuberculosis*, e avaliou as mutações mais freqüentes que levam à resistência aos medicamentos em pacientes com falha no tratamento ou recidiva. A vantagem do tempo de processamento em laboratório com os testes foi evidente quando as amostras foram processadas diretamente a partir de amostras de escarro, pois o tempo total desde receber a amostra até o resultado da suscetibilidade é de apenas 2-3 dias, em comparação com várias semanas ou meses, quando utilizamos ensaios tradicionais baseados em cultura.

Para a detecção de resistência à RIF, teste GenoType® MTBDR*plus* mostrou uma sensibilidade e uma especificidade de 82% e 94%, respectivamente, em relação ao TSA convencional. No entanto, para detectar a resistência à INH, a sensibilidade e especificidade do ensaio foram de 60% e 94%, respectivamente, em relação ao TSA convencional. Os resultados são um pouco inferiores do que outros estudos recentes, em que a sensibilidade do GenoType® MTBDR*plus* para a detecção de resistência a RIF e INH variaram de 92% a 99% e de 73% para 92%, respectivamente (MIOTTO *et al.*, 2008; LACOMA *et al.*; 2008; HILLEMANN *et al.*, 2007). No entanto, em outro estudo, quase metade das amostras que foram classificadas como INH

monoresistentes não foram corretamente identificados pelo GenoType® MTBDR_{plus}, resultando em subestimação da resistência à INH (31).

Resultados de alguns estudos (LING *et al.*, 2008; RIGOUTS *et al.*, 2011; JIN *et al.*, 2012) sugerem que o GenoType® MTBDR_{plus} é mais sensível para a detecção de resistência a RIF do que resistência à INH, e o mesmo foi observado em nosso estudo (82,0% contra 60,0% comparando com TSA convencional). Isto poderia ser explicado pelo fato de, para a resistência à RIF, as mutações no gene *rpoB*, ocorrerem em uma região bem definida enquanto as sondas para a resistência à INH GenoType® MTBDR_{plus} são específicos para *katG315* e *inhA* em codons -15 e -8. É bem conhecido que aproximadamente 10%-25% das cepas resistentes à INH tem mutações fora dos genes *KatG* e *inhA* (ZHANG & YEW, 2009.). Outros genes, tais como *kasA*, e a região intergênica *oxyR-ahpC* também estão envolvidos na resistência à INH, embora menos frequentemente do que as mutações mais estabelecidos no gene *KatG* e *inhA* (CARDOSO *et al.*, 2004). Outra explicação é a de que os sistemas de efluxo, podem também desempenhar um papel no desenvolvimento de resistência à INH. Isto ocorre muito cedo durante a exposição à INH e permite que as células sobrevivam, na presença desse antibiótico até uma mutação que confere elevado nível de resistência estável surja (VIVEIROS *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2012).

A rápida identificação de cepas resistentes aos medicamentos é importante para melhorar o manejo clínico de pacientes com TB, e para prevenir a transmissão de cepas resistentes aos medicamentos. O teste GenoType® MTBDR_{plus} é um ensaio confiável, rápido e fácil de realizar, que permite a detecção simultânea de resistência à INH e RIF em *M. tuberculosis*, directamente a partir de amostras escarro. Como o ensaio de MTBDR_{plus} mostrou 92% de uma boa sensibilidade para a detecção de resistência à RIF e 100% de especificidade e VPP para a detecção de TB-MDR, conclui-se que este ensaio permite a rápida identificação e tratamento de tuberculose multirresistente, antes que os resultados dos TSA convencional estejam disponíveis. Como ainda há discordância entre os métodos convencionais de TSA e moleculares, recomendamos que o GenoType® MTBDR_{plus} deve fornecer orientação inicial sobre a terapia. O teste deve ser seguido de confirmação fenotípica, pois o ensaios molecular não detecta todas as amostras resistentes às drogas, particularmente as que conferem resistência à INH e não detecta mutações raras em outros genes associados com a resistência. Mais estudos são necessários para avaliar o impacto da introdução

do ensaio GenoType® MTBDR*plus* sobre os resultados do tratamento, bem como a viabilidade e os custos associados com a sua implementação generalizada no Brasil.

Na etapa de desenvolvimento e padronização, o ensaio Detect-TBMDR, utilizado para detecção de resistência à RIF e INH, mostrou sensibilidade e especificidade de 79,3%, 77,0% e 100% e 65%, respectivamente, em relação ao TSA convencional. Quando comparado com o sequenciamento de DNA, o ensaio Detect-TBMDR, para detectar a resistência à RIF e INH, mostrou uma sensibilidade e uma especificidade de 81,2%, 94,7%, 100% e 96,2%, respectivamente. No entanto, ao comparar Detect-TBMDR com o GenoType® MTBDR*plus* os resultados foram um pouco inferiores do que quando comparado com o sequenciamento, mostrando sensibilidade e especificidade de 79,3% e 82% para detectar resistência à RIF e 100% e 95,6% para detectar resistência à INH. Assim, o nosso teste mostrou uma maior correlação com o padrão-ouro, o sequenciamento. Comparado com o sequenciamento de DNA, o método Detect-TBMDR pode ser realizado sem dispositivos onerosos, enquanto que os kits comerciais atuais são limitados à utilização em laboratórios de países desenvolvidos, pois possuem um custo elevado. Por estas razões, o teste Detect-TBMDR pode ser aplicado com sucesso como teste de sensibilidade rápido.

Em outro estudo, que desenvolveu um ensaio de hibridação em microplacas para detecção de resistência à RIF em *M. tuberculosis*, todas as nove amostras resistentes foram corretamente identificadas pelo método, no entanto, o número das amostras era muito pequena (GARCIA *et al.*, 2001.). HAN, *et al.* (2009) desenvolveram um ensaio de hibridação em microplacas para detecção de resistência à INH em *M. tuberculosis*, a sensibilidade global e a especificidade do ensaio de hibridação em micropoços foram de 74% com base no método convencional, e 100% com base no sequenciamento. Esses resultados foram semelhantes aos resultados encontrados em nosso estudo.

Mais estudos são necessários para implementar este teste em laboratórios de rotina. Os resultados mostraram uma maior correlação com sequenciamento, que é um padrão-ouro, do que com GenoType MDRTB*plus*. No entanto, quando comparado com o diagnóstico fenotípico (TSA), os resultados de correlação não foram tão significativos (Capítulo 3, Tabela 2). Isto é devido ao grande número de cepas resistentes à INH, pelo TSA, que não mostraram mutações nos genes estudados e algumas cepas resistentes à RIF, pelo método de DST, que não revelaram mutações na região estudada do gene *rpoB*. A falta de hibridização, o que representa a presença

da mutação, em algumas cepas sensíveis à RIF por DST, também influenciou este resultado. Por isso, os resultados de todos os testes genotípicos de suscetibilidade às drogas devem sempre ser confirmados por métodos fenotípicos.

O ensaio Detect-TBMDR pôde detectar rapidamente a presença de mutações pontuais dentro dos 81-pb do gene *rpoB*, a mutação mais comum no gene *katG* e *inhA* e pôde identificar o organismo como membro do complexo *M. tuberculosis*. O ensaio de hibridação de microplaca tem várias vantagens em relação aos ensaios convencionais de hibridação de oligonucleotídeos. Em primeiro lugar, o ensaio é fácil de realizar e interpretar, e utiliza equipamentos que estão disponíveis dentro de qualquer laboratório básico de biologia molecular e pode, portanto, ser realizado na rotina de laboratórios de microbiologia.

O controle efetivo da epidemia de TB resistente à medicamentos na população deve ter como objetivo reduzir tanto a transmissão da doença como a ocorrência de resistência adquirida. Este estudo demonstra que a integração de testes de sensibilidade com genotipagem e análise de dados epidemiológicos representa uma abordagem útil para o estudo da epidemiologia da TB resistente aos medicamentos.

Perspectivas

O presente estudo tem como perspectivas a validação interlaboratorial do teste Detect-TBMDR e o estudo do seu impacto numa rotina laboratorial. O possível transferência para uma plataforma automatizada, como microarranjo líquido.

Apresentação dos dados epidemiológicos para as instituições pertinentes para tomarem as medidas cabíveis.

REFERÊNCIAS

ASIIMWE, B.B.; GHEBREMICHAEL, S.; KALLENIOUS, G.; KOIVULA, T. and JOLOBA, M.L. Mycobacterium tuberculosis spoligotypes and drug susceptibility pattern of isolates from tuberculosis patients in peri-urban Kampala, Uganda. *BMC Infect Dis* 8:101, 2008.

BRASIL, 2010. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico, ano 10, nº 11, dezembro de 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_epi_n11_tb_dez2010_atual2.pdf.

BRASIL, 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL, 2012. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde – Brasil. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume 43 março – 2012. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bolepi_v43_especial_tb_correto.pdf

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J. R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W. M.; GORI, A.; AL-HAJAJ, S. A.; ALLIX, C.; ARISTIMUÑO, L.; ARORA, J. & BAUMANIS, V. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*, 6:23, 2006.

CAFRUNE, P. I.; POSSUELO, L. G.; RIBEIRO, A. W.; RIBEIRO, M. O.; UNIS, G.; JARCZEWSKI, C. A.; ROSSETTI, M. L. R.; AND ZAHA, A. Prospective study applying spoligotyping directly to DNA from sputum samples of patients suspected of having tuberculosis. *Can J Microbiol*, 55: 895–900, 2009.

CARDOSO, R. F.; COOKSEY, R. C.; GLENN, P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C. Q. F.; SATO, D. N.; SHIKAMA, M. L.; MAMIZUKA, E. M.; HIRATA, R. D. C.; AND HIRATA M. H. Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:373–3381, 2004.

COELHO, A. G. V.; ZAMARIOLI, L. A.; TELLES, M. A.; FERRAZOLI, L. & WALDMAN, E. A. A study of multidrug-resistant tuberculosis in risk groups in the city of Santos, São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(6): 760-766, 2012.

FARNIA, P.; MASJEDI, M. R.; VARAHRAM, M.; MIRSAEIDI, M.; AHMADI, M.; KHAZAMPOUR, M.; TABARSI, P.; BAGHEI, P.; MARJANE, M.; BAHADORI, M.; ZARIFI, AZ.; and VELAYATI, A. A. The recent-transmission of Mycobacterium tuberculosis strains among Iranian and Afghan relapse cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping. *BMC Infectious Disease*, 8:109, 2008.

GARCIA, L.; ALONSO-SANZ, M.; REBOLLO, M. J.; TERCERO, J. C.; and CHAVES, F. Mutations in the *rpoB* Gene of Rifampin-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in Spain and Their Rapid Detection by PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal Of Clinical Microbiology*, 39(5):1813–1818, 2001.

Han, H. E.; Lee, I. S.; Hwang, J. H.; Bang, H. E.; Kim, Y.; Cho, S.-N.; Kim, T. U.; et al. Microplate hybridization assay for detection of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *BMB reports*, 42(2), 81–5, 2009.

HILLEMANN, D.; RUSCH-GERDES, S. & RICHTER, E. Evaluation of the GenoType MTBDR*plus* assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:2635-40, 2007.

IGNATOVA, A.; DUBILEY, S.; STEPANSHINA, V.; and SHEMYAKIN, I. Predominance of multi-drug-resistant LAM and Beijing family strains among Mycobacterium tuberculosis isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia. *Journal of Medical Microbiology*, 55:1413–1418, 2006.

JIN, J.; ZHANG, Y.; FAN, X.; DIAO, N.; SHAO, L.; WANG, F.; HU, P.; WANG, S.; WENG, X.; ZHANG, W. Evaluation of the GenoType® MTBDR*plus* assay and identification of a rare mutation for improving MDR-TB detection. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 16(4):521–526, 2012.

LACOMA, A.; GARCIA-SIERRA, N.; PRAT, C.; RUIZ-MANZANO, J.; HABA, L.; ROSE'S, S.; MALDONADO, J.; DOMÍNGUEZ, J. Genotype MTBDR*plus* assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 46:3660-7, 2008.

LING, D. I.; ZWERLING, A. A.; PAI, M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *European Respiratory Journal*, 32: 1165–1174, 2008.

MACHADO, D.; COUTO, I.; PERDIGÃO, J.; RODRIGUES, L.; PORTUGAL, I.; BAPTISTA, P.; VEIGAS, B.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Contribution of Efflux to the Emergence of Isoniazid and Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*, 7(4): e34538, 2012.

MIOTTO, P.; PIANA, F.; CIRILLO, D. M.; MIGLIORI, G. B. Genotype MTBDR*plus*: A further step toward rapid identification of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46:393-4, 2008.

RIGOUTS, L.; HOZA, A. S.; DE RIJK, P.; TORREA, G.; CHONDE, T. M.; BASRA, D.; ZIGNOL, M.; VAN LETH, F.; EGWAGA, S. M.; VAN DEUN, A. Evaluation of the GenoType® MTBDR*plus* assay as a tool for drug resistance surveys. *International Journal of Infectious Disease*, 15(7):959–965, 2011.

TELLES, M. A. S.; FERRAZOLI, L.; WALDMAN, E. A.; GIAMPAGLIA, C. M. S.;

MARTINS, M. C.; UEKI, S. Y. M.; CHIMARA, E.; SILVA, C. A.; CRUZ, V.; WALKMAN, C. C. S.; HEYN, I.; UEHARA HIRONO, I. & RILEY, L. W. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in an urban community. *International Journal of Infectious Disease*, 9: 970-976, 2005.

VALCHEVA, V.; MOKROUSOV, I.; NARVSKAYA, O.; RASTOGI, N.; MARKOVA, N.; Molecular snapshot of drug-resistant and drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in Bulgaria. *Infection, Genetics and Evolution*, 8:657–663, 2008.

VIVEIROS, M.; PORTUGAL, I.; BETTENCOURT, R.; VICTOR, T. C.; JORDAAN, A. M.; LEANDRO, C.; ORDWAY, D.; AMARAL, L. Isoniazid-induced transient high-level resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2804–2810, 2002.

WHO, 2011. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control: WHO Report 2011.

ZHANG, Y. & YEW, W. W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13:1320-1330, 2009.

Bibliografia (CAPÍTULO I)

ALMEIDA DA SILVA, P.E. & PALOMINO J.C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011. doi: 10.1093/jac/dkr173.

ARANAZ, A.; LIENANA, E.; GOMEZ-MAMPASO, E.; GALAN, J.C.; COUSIN, D.; ORTEGA, A.; BLANQUEZ, J.; BLAQUERO, F.; MATEOS, A.; SUAREZ, G.; DOINGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol.* 49 Pt 3:1263-1273, 1999.

BARROSO E. C.; MOTA R. M. S.; MORAIS M. F. M.; CAMPELO C. L.; BARROSO J. B.; RODRIGUES J. L. N.; Fatores associados aos tratamentos inadequados em grupo de portadores de tuberculose multirresistente. *J Pneumol.* 29(6):350-7, 2003.

BODMER, T.; ZURCHER, G.; IMBODEN, P.; Telenti, A. Mutation position and type of substitution in the beta-subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35: 345–348, 1995.

BOEHME, C.; NEBETA, P.; HILLEMANN, D.; NICOL, M. P.; SHENAI, S.; KRAPP, F.; ALLEN, J.; TAHIRLI, R.; BLAKEMORE, R.; RUSTOMJEE, R.; MILOVIC, A.; JONES, M.; O'BRIEN, S. M.; PERSING, D. H.; RUESCH-GERDES, S.; GOTUZZO, E.; RODRIGUES, C.; ALLAND, D. & PERKINS, M. D. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*, 363:1005–1015, 2010.

BÖTTGER EC. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. *Clinical of Microbiology and Infection.* 17(8):1128-34., 2011

BRASIL, 1992. Ministério da Saúde do Brasil. Controle da Tuberculose. Uma aposta de integração ensino-serviço/CNCT/NUTES. 3 ed. rev. Rio de Janeiro, p. 29-30, 1992.

BRASIL, 2002a. Ministério da Saúde Tuberculose – guia de vigilância epidemiológica/elaborado pelo Comitê Técnico – Científico de Assessoramento à Tuberculose e Comitê Assessor para Co-infecção HIV-Tuberculose. – Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2002. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tuberculose.pdf.

BRASIL, 2002b. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª edição. Rio de Janeiro, FUNASA/CRPHF/SNPT, 2002.

BRASIL, 2007. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Tuberculose Multirresistente: guia de vigilância epidemiológica. Rio de Janeiro: Centro de Referência Prof. Hélio Fraga; 2007

BRASIL, 2008. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1133.

BRASIL, 2009. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes – Versão 2. Brasília, 2009. Disponível em http://www.saude.rs.gov.br/upload/1339785771_Nota%20T%C3%A9cnica%20sobre%20as%20Mudan%C3%A7as%20no%20Tratamento%20da%20Tuberculose%20no%20Brasil%20para%20Adultos%20e%20Adolescentes%20%20Vers%C3%A3o%202.pdf.

BRASIL, 2010a - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil 2010. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_tuberculose.pdf

BRASIL, 2010b. Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. Tuberculose, Guia de Vigilância Epidemiológica. Caderno 7. 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_tuberculose.pdf.

BRASIL, 2010c. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico, ano 10, nº 11, dezembro de 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_epi_n11_tb_dez2010_atual2.pdf.

BRASIL, 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

BRITO, R. C.; MELLO, F. C.; ANDRADE, M. K.; OLIVEIRA, H.; COSTA, W.; MATOS, H. J.; LOURENÇO, M. C.; ROLLA, V. C.; FONSECA, L.; RUFFINO NETTO, A. & KRITSKI, A. L. Drug-resistant tuberculosis in six hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 14: 24-33, 2010.

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J. R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W. M.; GORI, A.; AL-HAJAJ, S. A.; ALLIX, C.; ARISTIMUÑO, L.; ARORA, J. & BAUMANIS, V. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*, 6:23, 2006. doi:10.1186/1471-2180-6-23.

CANETTI, G.; FOX, W.; KHOMENKO, A.; MAHLER, H.T.; MENON, N.K.; MITCHISON, D.A.; RIST, N.; & SMELEV, 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* 41:21–43, 1969.

CAVIEDES, L.; LEE, T. S.; GILMAN, R. H.; SCHEEN, P.; SPELLMAN, E.; LEE, E. H.; BERG, D. E.; MONTENEGRO-JAMES, S. M., and The Tuberculosis Working Group in Peru. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. *J Clin Microbiol*, 38(3):1203-1208, 2000.

CEVS. Centro Estadual de Vigilância em Saúde/RS. 2012, Comunicação pessoal.

COELHO, A. G. V.; ZAMARIOLI, L. A.; TELLES, M. A.; FERRAZOLI, L. & WALDMAN, E. A. A study of multidrug-resistant tuberculosis in risk groups in the city of Santos, São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(6): 760-766, 2012.

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

COLSTON, M. J. & COX, R. A. Mycobacterial growth and dormancy. In: *Mycobacteria: molecular biology and virulence*. 1st ed. London: Blackwell Science p.198-219, 1999.

CONDE, M. B.; MELO, F. A. F.; MARQUES A. M. C.; CARDOSO N. C.; PINHEIRO V. G. F.; DALCIN P. T. R. et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J. bras. pneumol.* 35(10): 1018-1048, 2009.

DALCOLMO, M. P.; ANDRADE, M. K. N.; PICON, P. D. Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control. *Rev Saúde Pública* 41(Supl. 1):34-42, 2007.

HELB, D.; JONES, M.; STORY, E.; BOEHME, C.; WALLACE, E.; HO, K.; KOP, J.; OWENS, M. R.; RODGERS, R.; BANADA, P.; SAFI, H.; BLAKEMORE, NGOC LAN, R. N. T.; JONES-LOPEZ, E. C.; LEVI, M.; BURDAY, M.; AYAKAKA, I.; MUGERWA, R. D.; MCMILLAN, B.; 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*, 48(1):229-37, 2010.

VAN DOORN, H.R.; AN, D.D.; DE JONG, M.D.; LAN, N.T.; HOA, D.V.; QUY, H.T.; CHAU, N.V.; DUY, P.M.; THO, D.Q.; CHINH, N.T.; FARRAR, J.J. & CAWS,

M. Fluoroquinolone resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* with locked nucleic acid probe real-time PCR. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 12, 736–742, 2008.

FANG, Z.; MORRISON, N.; WATT, B.; DOIG, C. & FORBES, K. J. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal of Bacteriology*, 180(8):2102–2109, 1998.

FEUERRIEGEL, S.; COX, H. S.; ZARKUA, N.; KARIMOVICH, H. A.; BRAKER, K.; RUSCH-GERDES, S.; & NIEMANN, S. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 53:3353–3356, 2009.

FILLIOL, I.; FERDINAND, S.; NEGRONI, L.; SOLA, C. & RASTOGI, N. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:2520-2524, 2000.

FINKEN, M.; KIRSCHNER, P.; MEIER, A.; WREDE, A. & BÖTTGER, E. C. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutation within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Molecular Microbiology*, 9:1239–1246, 1993.

FOXMAN, B. & RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. *American Journal of Epidemiology*, 153:1135-41, 2001.

FUCHS, F. D. & WANNACHER, L. Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1992.

GAGNEUX, S. & SMALL, P. M. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infectious Diseases*, 7 (5), 328–337, 2007.

GILLESPIE, S. H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46(2):267-274, 2002.

GINSBURG, A. S.; HOOPER, N.; PARRISH, N.; DOOLEY, K. E.; DORMAN, S. E.; BOOTH, J.; DIENER-WEST, M.; MERZ, W. G.; BISHAI, W. R. & STERLING, T. R. Fluoroquinolone resistance in patients with newly diagnosed tuberculosis. *Clinical Infectious Disease*, 37: 1448–1452, 2003.

GOODFELLOW, M. & MAGGE, J.G. Taxonomy of mycobacteria. In Gangadharam P. R. J., Jenkins, P.A. (ed). *Mycobacteria – Basic Aspects*. Chapman & Hall. New York, 1998.

GOULDING, J. N.; STANLEY, J.; SAUDERS, N. & ARNOLD C. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of

Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(3):1121-1126, 2000.

HAUSDORFER, J.; SOMPEK, E.; ALLERBERGER, F.; DIERICH, M. P. & RÜSCH-GERDES, S. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2(9):751-755, 1998.

HEIFETS, L.; LINDER, T.; SANCHEZ, T.; SPEMCKER, D., & BRENNAN, J. Two liquid medium systems, *Mycobacterium* Growth Indicator Tube and MB Redox Tube, for *Mycobacterium tuberculosis* isolation from sputum specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3):1227-1230, 2000.

HONORE, N. & COLE, S. T. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38: 238–242, 1994.

JUREEN, P.; WERNGREN, J.; TORO, J. C. & HOFFNER, S. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 1852–1854, 2008.

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 strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4):907-914, 1997.

KENT, P. T. & KUBICA, G. P. *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*. Atlanta, GA: Centers for Diseases Control, 1985.

KIVI, M. L.; XUEMIN, S.; RAYCHAUDHURI, R.; ALTMAN, B. & SMALL, P. M. Determining the genomic locations of repetitive DNA sequence with a whole genome microarray IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6):2192-2198, 2002.

LAURENZO D. & MOUSA S. A. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta Tropica* 119(1):5-10, 2011.

LEE, J. J.; SUO, J.; LIN, C. B.; WANG, J. D.; LIN, T. Y.; TSAI, Y.C. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 7(6):569-74, 2003.

LIENHARDT, C.; GLAZIOU, P.; UPLEKAR, M.; LÖNNROTH, K.; GETAHUN, H.; RAVIGLIONE, M. Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. *Nature Reviews Microbiology* , 14;10(6):407-16, 2012. doi:10.1038/nrmicro2797.

MARTIN, A. & PORTALES, F. In: Palomino JC; Leão SC, Ritacco V. Chapter 19: Drug Resistance and Drug Resistance Detection. *Tuberculosis 2007 - From basic*

science to patient care. 1^a ed. 2007.

MCNERNEY, R.; WILSON, S. M.; SIDHU, A. M.; HARLEY, V. S.; AL SUWAIDI, Z.; NYE, P. M.; PARISH, T.; STOKER, N. G. Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as a tool for the detection of viable *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. *Research in Microbiology*, 149(7):487-95, 1998.

MATHEMA, B.; KUREPINA, N.E.; BIFANI, P.J.; KREISWIRTH, B.N.; Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(4):658–685, 2006.

Matos, E. D.; Lemos, A. C.; Bittencourt, C. & Mesquita, C. L. Anti-tuberculosis drug resistance in strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in a tertiary hospital in Bahia. *Braz J Infect Dis* 11, 331—338, 2007.

MAUS, C. E.; PLIKAYTIS, B. B. & SHINNICK, T. M. Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 571–577, 2005.

Mestdagh M, Fonteyne P A, Realini L, et al. Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 2317–2319, 1999.

MIDDLEBROOK G. Isoniazid resistance and catalase activity of tubercle bacilli. *American Review Tuberculosis*, 69: 471–472, 1954.

MITCHISON, D. A. The action of anti-tuberculosis drugs in short course chemotherapy. *Tubercle*, 66: 219–225, 1985.

MONTORO, E.; LEMUS, D.; ECHEMENDIA, M.; MARTIN, A.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55:500-505, 2005.

NATAL, S.; VALENTE, J. G.; SANCHEZ, A. R.; PENNA, M. L. Isoniazid and rifampicin resistance and prior treatment for tuberculosis. *Caderno de Saúde Pública*. 19, 1277—1281, 2003.

OKAMOTO, S.; TAMARU, A.; NAKAJIMA, C.; NISHIMURA, K.; TANAKA, Y.; TOKUYAMA, S.; SUZUKI, Y. & OCHI, K. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Molecular Microbiology*, 63:1096-1106, 2007.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2720-2722, 2002.

PARK, Y. Z.; KIM, B. J.; RYU, S.; KOOK, Y. H.; CHOE, Y. K.; BAI, G. H. & KIM, S. J. Cross-resistance between rifampicin and KRM-1648 is associated with specific *rpoB* alleles in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 6(2):166-170, 2002.

PINTO, W. P.; HADAD, D. J.; SILVA TELLES, M. A.; UEKI, S. Y.; PALACI, M.; BASILE, M. A. Tuberculosis and drug resistance among patients seen at an AIDS Reference Center in São Paulo, Brazil. *International Journal of Infectious Disease*, 5:93-100, 2001.

RAMASWAMY, S. V.; AMIN, A. G.; GOKSEL, S.; STAGER, C. E.; DOU, S. J.; EL SAHLY, H.; MOGHAZEH, S. L.; KREISWIRTH, B. N.; MUSSER, J. M. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 326– 336, 2000.

ROBERT KOCH - The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 1905. Nobel Lecture. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2013. Visualizado dia 20 de junho de 2013. Disponível em <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1905/koch_lecture.html>

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*, 10:1052-1057, 2010.

SCORPIO, A. & ZHANG, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine*, 2: 662–667, 1996.

SHABBEER, A.; OZCAGLAR, C.; YENER, B. & BENNETT, K.P. Web tools for molecular epidemiology of tuberculosis *Infection, Genetics and Evolution. Nature Medicine*, 12:767–781, 2012.

SHIMIZU, Y.; DOBASHI, K.; YOSHIKAWA, Y.; YABE, S.; HIGUCHI, S.; KOIKE, Y.; MITA, Y.; UTSUGI, M.; ENDOU, K.; TAKAHASHI, K.; WATANABE, S.; SAITO, R. & MORI, M. Five-antituberculosis drug-resistance genes detection using array system. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 42, 228–234, 2008.

SMS/POA 2008. Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde. Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre. Boletim Epidemiológico - Ano X, Nº 36, Fev 2008. Disponível em http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/sms/usu_doc/boletim_36_fevereiro_2008.pdf.

SMS/POA 2010. SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. PREFEITURA MUNICIPAL DE PORTO ALEGRE. PLANO MUNICIPAL DE SAÚDE 2010-2013. Disponível em : http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/sms/usu_doc/pms.pdf.

SMS/POA 2012. Núcleo das Crônicas/EVDT/CGVS/SMS/POA. Análise Epidemiológica da Tuberculose em Porto Alegre no período de 2001 a 2011, com destaque à situação epidemiológica de 2011. Disponível em: http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/analise_epidemiologica_da_tuberculose.pdf

SOINI, H. & MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clinical Chemistry*, 47(5):809-814, 2001.

SOLA, C.; FILLIOL, I.; GUTIERREZ, M. C.; MOKROUSOV, I.; VINCENT, V.; RASTOGI, N. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerging Infectious Disease Journal*, 7:390-396, 2001.

SOMOSKOVI, A.; DORMANDY, J.; MITSANI, D.; RIVENBURG, J. & SALFINGER, M. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based Genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12):4459-63, 2006.

Spies, F. S.; da Silva, P. E.; Ribeiro, M. O.; Rossetti, M. L. & Zaha, A. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52:2947-2949, 2008.

SREEVATSAN, S.; STOCKBAUER, K.; PAN, X.; KREISWIRTH, B. N.; MOGHAZEH, S. L.; JACOBS JR, W. R.; TELENTI, A. & MUSSER, J. M. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 1677–1681, 1997.

TAKAYAMA, K. & KILBURN, J. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33: 1493–1499, 1989.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; LOWRIE, D.; COLE, S.; COLSTON, M. J.; MATTER, L.; SCHOPFER, K.; & BODMER, T. Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 341: 647–650, 1993.

TELENTI, A.; PHILIPP, W. J.; SREEVATSAN, S.; BERNASCONI, C.; STOCKBAUER, K. E.; WIELES, B.; MUSSER, J. M.; JACOBS Jr. & W. R. The *emb* operon, a unique gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature Medicine*, 3: 567–570, 1997.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; SCHIDHEINI, T. & BODMER, T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(10):2054-2058, 1993a.

TELLES, M. A. S.; FERRAZOLI, L.; WALDMAN, E. A.; GIAMPAGLIA, C. M. S.;

MARTINS, M. C.; UEKI, S. Y. M.; CHIMARA, E.; SILVA, C. A.; CRUZ, V.; WALKMAN, C. C. S.; HEYN, I.; UEHARA HIRONO, I. & RILEY, L. W. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in an urban community. *International Journal of Infectious Disease*, 9: 970-976, 2005.

TORTOLI, E. & MARCELLI F. Use of the INNO LiPA Rif.TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility, *European Journal Clinical Microbiology & Infectious Disease*, 26:51–55, 2007.

van Embden, J.D.; Cave, M.D.; Crawford, J.T.; Dale, J.W.; Eisenach, K.D.; Gicquel, B.; Hermans, P.; Martin, C.; McAdam, R.; Shinnick, T.M.; et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (2), 406–409, 1993.

VILCHÈZE, C. & JACOBS JR., W.R. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annual Review of Microbiology*, 61:35–50, 2007.

WHO, 1997. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The WHO/IUALTD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Geneva, (WHO/TB/1997.229), 1997.

WHO, 2009. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis in the Region of the Americas 2009 EPIDEMIOLOGY, CONTROL AND FINANCING REGIONAL REPORT

WHO, 2010. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) 2010 GLOBAL REPORT ON SURVEILLANCE AND RESPONSE.

WHO, 2011. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control: WHO Report 2011.

WILLIAMS, D. L.; SPRING, L.; COLLINS, L.; MILLER, L. P.; HEIFETS, L. B.; GANGADHARAM, P. R.; GILLIS, T. P. Contribution of rpoB mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 1853–1857, 1998.

WINDER F. Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of mycobacteria. In: Ratledge C, Stanford J, eds. The biology of mycobacteria. Vol I. New York, NY, USA: Academic Press, 354–438, 1982.

WILLIAMS, D. L.; WAGUESPACK, C.; EISENACH, K.; CRAWFORD, J. T.; PORTAELS, F.; SALFINGER, M.; NOLAN, C. M.; ABE, C.; STICH-GROH, V., & GILLIS, T. P. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(10):2380-2386, 1994.

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

ZHANG, Y. & TELENTI, A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Hatfull G, Jacobs W R, eds. *Molecular genetics of mycobacteria*. Washington DC, USA: ASM Press, pp 235–254, 2000.

ZHANG, Y. & MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 7: 6–21, 2003.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45:529-564, 2005.

ZHANG, Y. & YEW, W. W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13:1320-1330, 2009.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Projeto: Validade e performance de novos métodos moleculares no diagnóstico de Tuberculose Resistente

O presente estudo tem o objetivo de testar uma metodologia nova para realizar o diagnóstico de susceptibilidade juntamente com o estudo do bacilo causador da tuberculose. O diagnóstico mais rápido desta doença e a caracterização da susceptibilidade permite que o tratamento adequado seja iniciado evitando que a doença se espalhe. O estudo dos bacilos é importante para que se tenha um melhor conhecimento da doença e novas estratégias de combate possam ser desenvolvidas e você está convidado a participar deste estudo. Sua participação é completamente voluntária e sua decisão de participar ou não do estudo não modificará o atendimento que você receberá nesta unidade.

Caso você aceite, um funcionário vai coletar, inicialmente, duas amostras do seu escarro. Você só precisará escarrar em um pote que lhe será oferecido. A coleta de escarro não oferece nenhum risco para sua saúde. Além disso, você deverá responder algumas perguntas sobre a sua saúde. O seu escarro será enviado ao laboratório para realização de exames sobre o efeito dos remédios sobre a bactéria e você será informado do resultado.

Alguns resultados de exames de rotina feitos por você e dados de sua ficha serão utilizados na pesquisa, se você permitir que sejam copiados do prontuário. Nenhum exame além do escarro será solicitado para pesquisa. O seu nome nunca será utilizado na pesquisa.

Esta pesquisa tem o objetivo de contribuir para a escolha do melhor tratamento desta doença.

Se você permitir, as culturas de micobactérias obtidas a partir de seu escarro serão estocadas (guardadas) em freezer -20°C para confirmação dos resultados e/ou utilização em futuras pesquisas, desde que estas sejam aprovadas pelo comitê de ética em Pesquisa da instituição proponente.

Finalmente, você deve saber que pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para você.

Se você concordar em participar do estudo, assine na linha abaixo:

Nome: _____

Assinatura do voluntário Data: ____/____/____

Assinatura do entrevistador Data: ____/____/____

Assinatura do coordenador do estudo Data: ____/____/____

Obs: O presente documento, baseado no item IV das diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do voluntário ou de seu responsável legal e outra com o pesquisador responsável.

Se, após concordar em participar, você tiver qualquer dúvida a respeito do estudo ou dos seus direitos, você pode contatar a Msc: Raquel de Abreu Maschmann no telefone (51) 33520336

QUESTIONÁRIO

Projeto: Validade e performance de novos métodos moleculares no diagnóstico de Tuberculose Resistente

1. CASO N^o: _____
2. PRONTUÁRIO N^o: _____
3. DATA DO QUESTIONÁRIO: _____
4. NOME: _____
5. ENDEREÇO: _____
6. IDADE: () anos
7. Data de nascimento: ____/____/____
8. SEXO: Masc (1) Fem (2)
9. COR ou RAÇA: Branca(1) Preta(2) Amarelo(3) Pardo(4) Indígena(5)
10. Estado Civil () Acompanhado () Não acompanhado
11. Profissão: _____
12. Renda familiar: () Sem renda () 1 a 3 salários mínimos () de 3 a 5 () mais de 5 () IGN
13. Escolaridade: () Analfabetismo () _____ série do _____ grau (____) anos de estudo
14. Tuberculose anterior: () Sim () Não () IGN
- a) Tipo: () Pulmonar () Extrapulmonar () Ambos () IGN

15.

Tratamentos anteriores										
Trat	Ano (início)	Medicamentos (Marcar com "X")							Tratamento: 1 - Regular 2 - Irregular 3 - Ignorado	Resultado do tratamento 1 - Cura 2 - Abandono 3 - Falência
		R	H	Z	M	S	E	O		
1 ^o										
2 ^o										
3 ^o										
4 ^o										
5 ^o										
6 ^o										
7 ^o										
8 ^o										
9 ^o										
10 ^o										

R= rifampicina M= etambutol O= ofloxacina H= isoniazida S= estreptomicina

Z= pirazinamida E= etionamida

Tratamento irregular = Paciente falhou em tomar medicação mais que 20% do tempo estimado ou tomou menos que 80% da medicação entregue durante todo o tratamento.

32.

Tratamento atual												
Início (mês e ano)	Peso inicial	Medicamentos (Marcar com "X")							Tratamento: 1 - Regular 2 - Irregular 3 - Ignorado	Final (mês e ano)	Peso final	Resultado do tratamento 1 - Cura 2 - Abandono 3 - Falência
		R	H	Z	M	S	E	O				

33.b) Teste de mantoux: () Realizado, resultado _____ mm () Não realizado

34. Bacioscopia: () Positivo + () Positivo ++ () Positivo +++
() Negativo () IGN

35. Peso _____ Altura _____ IMC= _____

36. Cicatriz vacinal: Sim(1) Não(2)

37. Preenchido por: Nome: _____
Data: _____

**COMITÊ DE ÉTICA NA PESQUISA EM SAÚDE
ESCOLA DE SAÚDE PÚBLICA**

PARECER DE APROVAÇÃO

Data da aprovação: 16/06/2009

Protocolo CEPS-ESP n.º 465/09

Projeto: Validade e performance de métodos moleculares no diagnóstico de Tuberculose Resistente.

Pesquisador(a) Responsável: Raquel de Abreu Maschmann

Orientador(a): Maria Lucia Rosa Rosseti


Este projeto está de acordo com as normas éticas e metodológicas do Comitê de Ética na Pesquisa em Saúde da Escola de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Sul e conforme a Resolução CNS n.º 196/96.



**Nara Regina Moura de Castilhos
Coordenadora do Comitê de Ética na Pesquisa em Saúde
Escola de Saúde Pública/SES/RS**

20/01/2013

< Uso exclusivo do INPI >

INPI INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 PROTOCOLO GERAL
 25/01/2013 016130000327
 11:03 DERS

 BR 10 2013 001898 8
 Espaço para etiqueta

Espaço reservado ao protocolo

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
- 1.2 Qualificação: INST. PÚBLICA DE ENSINO SUP
- 1.3 CNPJ/CPF: 92969856000198
- 1.4 Endereço Completo: AV. PAULO GAMA, 110 - CENTRO, PORTO ALEGRE - RS, Brasil
- 1.5 CEP: 90040-060 1.6 Telefone: 51 3308 3800 1.7 Fax: 51 3308 4237
- 1.8 E-mail: sedetec@ufrgs.br

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Patente de Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS RESISTENTES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E KIT DE DIAGNÓSTICO/PROGNÓSTICO DE TUBERCULOSE

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº Data de Depósito:

5. Prioridade: interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: MARIA LUCIA ROSA ROSETTI
- 6.2 Qualificação: FARMACEUTICA 6.3 CPF: 26511410030
- 6.4 Endereço completo: R. DONA OTTI, 157/201, PORTO ALEGRE - RS
- 6.5 CEP: 6.6 Telefone: 51-33520336 6.7 Fax:
- 6.8 E-Mail: mrossett@terra.com

continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).
- Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- Listagem de sequências em formato impresso: fls.
- Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	11 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	2 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Portaria de Competência; cópia do Diário Oficial da União.				4 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 20 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Porto Alegre, 24/01/2013

Local e Data



Assinatura e Carimbo
Drª Raquel S. Mauler
Secretária de Desenvolvimento
Tecnológico
INFRGS

ANEXO DE DEPOSITANTES

Título: MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS RESISTENTES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E KIT DE...

Página 1

Nome: FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PRODUÇÃO E PESQUISA EM SAÚDE (FEPPS)

Qualificação:

CNPJ / CPF / Número INPI: 00689359/0001-18

Endereço Completo: AV. IPIRANGA, 5300 - JARDIM BOTÂNICO, PORTO ALEGRE - RS, Brasil

CEP: 90610-000

Telefone: 51-33520336

FAX:

E-mail:
