



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Avaliação do desempenho da PCR Multiplex alelo específico para
detecção de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à
resistência a Rifampicina e Isoniazida, a partir de amostra clínica

MÁRCIA ALVES DE SOUZA

MANAUS-AM
2013



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

MÁRCIA ALVES DE SOUZA

Avaliação do desempenho da PCR Multiplex alelo específico para detecção de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência à Rifampicina e à Isoniazida, a partir de amostra clínica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Professora Doutora Aya Sadahiro

Co-orientador: Doutor Mauricio Morishi Ogusku

MANAUS-AM
2013

Fixa Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

	Souza, Márcia Alves de
S729a	Avaliação do desempenho da PCR Multiplex alelo específico para detecção de genes de Mycobacterium tuberculosis associados à resistência à Rifampicina e à Isoniazida, a partir de amostra clínica / Márcia Alves de Souza. - Manaus: UFAM, 2013. 88 f.; il. color. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013. Orientadora: Prof ^ª . Dra. Aya Sadahiro Co-orientador: Dr. Mauricio Morishi Ogusku 1. Mycobacterium tuberculosis 2. Tuberculose 3. Farmácia I. Sadahiro, Aya (Orient.) II. Ogusku, Mauricio Morishi III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título
	CDU (2007): 616.24-002.5(043.2)



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Candidata: Márcia Alves de Souza

Título: Avaliação do desempenho da PCR Multiplex alelo específico para detecção de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência à Rifampicina e Isoniazida, a partir de amostra clínica.

Orientadora: Professora Doutora Aya Sadahiro

Co-orientador: Doutor Mauricio Morishi Ogusku

() APROVADO

() NÃO APROVADO

Professora Doutora Aya Sadahiro (ICB/UFAM)
(Presidente)

Professora Doutora Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto (FM/UFAM)
(Membro titular)

Professora Doutora Marlúcia Silva Garrido (FVS/SUSAM)
(Membro titular)

*A minha **mãe** e meu **pai**, pelo exemplo de vida e família.*

*Aos meus **irmãos** pelo apoio e incentivo.*

*Ao meu **esposo**, pela compreensão e companheirismo.*

*A minha **filha** pelo carinho e alegria.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela força, perseverança e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus **pais e irmãos** que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu esposo **Marcos de Oliveira Nery** pelo companheirismo e amor, me apoiando nos momentos de dificuldades.

A minha filha **Millena Vitória de Souza Nery** que embora não tivesse conhecimento disto, iluminava-me de maneira especial ao longo desse tempo.

A Doutora **Aya Sadahiro** pela oportunidade, conhecimento, confiança e compreensão na orientação, que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Ao Doutor **Mauricio Morishi Ogusku**, pesquisador do INPA (Instituto Nacional de pesquisa na Amazônia) pela paciência na co-orientação e principalmente pelo auxílio em toda metodologia e escrita desta dissertação.

A Doutora **Julia Ignez Salem**, pesquisadora do INPA pelas sugestões valiosas para a montagem do fluxograma das atividades da descrição metodológica.

A banca examinadora da aula de qualificação composta pela Doutora **Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto**, Doutor **João Vicente Braga de Souza** e Doutor **José Pereira de Moura Neto**, que forneceram sugestões importantes para a execução deste trabalho.

A todos os **professores** do Mestrado por todo conhecimento passado.

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** pela concessão da bolsa de mestrado.

A Doutora **Irineide Assumpção Antunes** por abrir as portas da Policlínica Cardoso Fontes para seleção dos pacientes.

A equipe da **Policlínica Cardoso Fonte**, em especial **Maria José de Oliveira de Souza** que sempre estavam dispostas a ajudar na seleção e dados dos pacientes.

A equipe técnica do laboratório de Micobacteriologia do INPA, **Francisco Farias de Carvalho**, **Raimundo Bezerra do Nascimento** e **Rosalvo Balbino da Silva**, pela convivência e por estarem sempre pacientes auxiliando nas técnicas, na esterilização e preparação de materiais e reagentes.

A **Alita Moura de Lima** pela força e amizade, me fazendo sorrir nos momentos de desânimo.

A Ana Paula Miranda Barros, pelo auxílio nos testes de sensibilidade aos fármacos.

Aos meus colegas do INPA e do Mestrado, Joquebede Chaves, Vanessa Alves de Almeida, Renata Freitas, Dhemerson Souza de Lima, Rafaela Honorato Barletta Naveca e Cláudia Maria Melo da Silva que sempre se propuseram a ajudar nos momentos mais difíceis.

A todos os meus colegas professores da UNINORTE e Laboratório Manoel Bastos Lira, que me deram força e incentivo em toda jornada.

Aos coordenadores da UNINORTE, Neila Soares Picanço, Lia Mizobe Ono e Manoel Luiz Neto pela compreensão e liberação de minhas atividades como professora para o término deste trabalho.

Ao professor Luiz Francisco Rocha e Silva, que sempre me apoiou e intercedeu junto à coordenação de Farmácia da UNINORTE, na elaboração da carga horária como professora para que nunca fosse compatível com o horário do Mestrado.

As diretoras do Laboratório Manuel Bastos Lira Rosilene da Silva Jucá e Rosana Abreu dos Santos Leitão que sempre apoiaram e facilitaram minhas saídas do laboratório para resolver atividades relacionadas ao mestrado.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente, meus mais sinceros agradecimentos.

“A felicidade às vezes é uma bênção, mas geralmente é uma conquista. O instante mágico do dia nos ajuda a mudar; nos faz ir em busca de nossos sonhos. Vamos sofrer, vamos ter momentos difíceis, vamos enfrentar muitas decepções, mas tudo é passageiro, e não deixa marcas. E no futuro, podemos olhar para trás com orgulho e fé.”

Paulo Coelho

RESUMO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo considerada um grave problema de saúde pública mundial. Atualmente, isolados de *M. tuberculosis* resistentes a pelo menos um medicamento utilizado no tratamento da TB tem sido documentados em todos os países. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a TB multirresistente (TBMR) é definida quando, isolados de *M. tuberculosis* de pacientes apresentam resistência a pelo menos Isoniazida e Rifampicina, os dois fármacos fundamentais no tratamento da TB. A resistência à Rifampicina tem sido associada às mutações gênicas no bacilo, no gene *rpoB* (referentes aos códons 531, 526 e 516). Para a Isoniazida, as mutações associadas à resistência têm sido relatadas nos genes *katG*, *inhA*, *ahpC* e *kasA*, sendo que a mutação no gene *katG*, referente ao códon 315, tem sido a mais citada para resistência a este fármaco. Neste contexto, métodos moleculares têm sido propostos pra detecção de mutações gênicas, em isolados de *M. tuberculosis*, que possam estar associadas à resistência aos fármacos. O presente estudo avaliou o desempenho da PCR multiplex alelo específico (PCR-MAS), diretamente em 86 amostras de escarro de pacientes com TB pulmonar multibacilares (n=42) e paucibacilares (n=44) da Policlínica Cardoso Fonte. A PCR-MAS teve como alvos: os genes *katG*, *inhA* e *rpoB*. A concordância entre a PCR-MAS e o Método de Redução de Nitrato foi avaliada utilizando o teste *kappa* e a associação entre as mutações gênicas e a resistência fenotípica aos fármacos foi realizada pelo teste exato de Fisher. A análise de concordância, pelo teste *kappa*, foi realizada entre as PCR-MAS a partir de amostra de escarro e de isolados de *M. tuberculosis*. A PCR-MAS apresentou fraca concordância com o Método de Redução de Nitrato, pois de 18 amostras resistentes à Isoniazida, apenas em 4 (22,2%) foram detectadas as mutações para o gene *katG* ou *inhA*. No entanto, a avaliação da sensibilidade fenotípica à Rifampicina, apresentou boa concordância com a PCR-MAS (*kappa* = 0,7237), quando as amostras foram de pacientes de TB pulmonar multibacilar. Além disso, houve associação da presença de mutações no gene *rpoB* com resistência fenotípica à Rifampicina (*p* = 0.0014). Em relação a concordância entre as PCR-MAS, de amostras de escarro e seus respectivos isolados de *M. tuberculosis*, o desempenho foi excelente quando testados em amostras de pacientes com TB pulmonar multibacilar, para detecção de mutações no gene *rpoB* (*kappa* = 0,7742). Portanto, os resultados obtidos com a PCR-MAS, a partir de amostras de escarros, foram satisfatórios e poderão ser utilizados para monitorar e pesquisar as mutações associada à resistência à Rifampicina em pacientes de TB multibacilar na rede básica de saúde, pois é um teste rápido, reprodutível e de menor custo.

Palavras Chave: *Mycobacterium tuberculosis*; TB multirresistente (TBMR); PCR-MAS, Tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is considered a serious public health problem worldwide. Currently, isolates of *M. tuberculosis* resistant to at least one drug used in the treatment of TB has been documented in all countries. According to the World Health Organization (WHO) multidrug-resistant TB (MDR-TB) is defined as isolates of *M. tuberculosis* patients showed resistance to at least Isoniazid and Rifampicin, the two key drugs for treating TB. Resistance to Rifampicin has been associated with genetic mutations in *M. tuberculosis*, in *rpoB* gene (refer to codons 531, 526 and 516). For Isoniazid resistance-associated mutations have been in the genes *katG*, *inhA*, *ahpC* and *kasA*. The mutation in the *katG* gene, related to codon 315, has been the most often cited for resistance to this drug. In this context, molecular methods have been proposed for detection of gene mutations in isolates of *M. tuberculosis* which may be associated with drug resistance. This study evaluated the performance of Multiplex Allele Specific PCR (MAS-PCR), in 86 sputum samples from patients with multibacillary pulmonary TB (n = 42) and paucibacillary (n = 44) of Policlínica Cardoso Fontes. The MAS-PCR had as targets: genes *katG*, *inhA* and *rpoB*. The agreement between the MAS-PCR and Reduction Method Nitrate was assessed using the *kappa* test and the association between genetic mutations and phenotypic resistance to drugs was performed by Fisher's exact test. The concordance analysis, the *kappa* test was performed between the MAS-PCR from sputum samples and isolates of *M. tuberculosis*. MAS-PCR showed poor agreement with Method Nitrate Reduction, for 18 strains resistant to Isoniazid, only 4 (22.2%) were detected for mutation *katG* gene or *inhA*. However, the evaluation of phenotypic susceptibility to Rifampin, showed good agreement with the MAS-PCR (*kappa* = 0.7237), from samples of multibacillary pulmonary TB patients. In addition, there was an association of the presence of mutations in the *rpoB* gene with phenotypic resistance to Rifampin (*p* = 0.0014). Regarding the correlation between the MAS-PCR of sputum samples and their respective isolates of *M. tuberculosis*, the performance was excellent when tested in samples from patients with pulmonary TB multibacillary to detect mutations in the *rpoB* gene (*kappa* = 0.7742). Therefore, the results obtained with the MAS-PCR from sputum samples were satisfactory and may be used to monitor and investigate the mutations associated resistance to Rifampin in primary health care, as is a rapid, reproducible and inexpensive.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, multidrug-resistant TB (MDR-TB), MAS-PCR, Tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1.	Estrutura da parede celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
Figura 2.	Bacilos álcool-ácido resistentes.....	21
Figura 3.	Fases de infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
Figura 4.	Taxa global de incidência de Tuberculose.....	25
Figura 5.	Números globais de casos de Tuberculose multirresistente.....	26
Figura 6.	Esquema representativo dos mecanismos de ação dos fármacos de “primeira linha” utilizados no tratamento da TB.....	28
Figura 7.	Fluxograma das atividades.....	48
Figura 8.	Percentual de resistência dos isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em pacientes multibacilares e paucibacilares.....	57
Figura 9.	Distribuição da condição dos pacientes de TB que apresentaram isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistentes a Isoniazida e/ou Rifampicina..	58
Figura 10.	PCR-MAS a partir de amostras de escarro e PCR-MAS a partir de cultivo de <i>M. tuberculosis</i>	59
Quadro 1.	Esquema Básico de Tratamento da TB.....	29
Quadro 2.	Parâmetros de amplificação para a PCR - IS6110.....	49
Quadro 3.	Parâmetros de amplificação para PCR-MAS.....	53

LISTA DETABELAS

Tabela 1.	Oligonucleotídeos para PCR-MAS para detecção de mutações em <i>M. tuberculosis</i> associadas às resistências para Rifampicina e Isoniazida.....	52
Tabela 2.	Características gerais dos pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar multibacilar e paucibacilar, com cultivo positivo para <i>M. tuberculosis</i>	56
Tabela 3.	Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para as mutações dos genes <i>katG</i> ou <i>inhA</i> , em 69 amostras de pacientes com TB pulmonar multibacilar e paucibacilar.....	60
Tabela 4.	Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para as mutações dos genes <i>katG</i> ou <i>inhA</i> em 42 amostras de pacientes com TB pulmonar multibacilar.....	61
Tabela 5.	Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para as mutações dos genes <i>katG</i> ou <i>inhA</i> em 27 amostras de pacientes com TB pulmonar paucibacilar.....	61
Tabela 6.	Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para a mutação do gene <i>rpoB</i> em 69 amostras de pacientes com TB pulmonar multibacilar e paucibacilar.....	62
Tabela 7.	Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para a mutação do gene <i>rpoB</i> em 42 amostras de pacientes com TB pulmonar multibacilar.....	62
Tabela 8.	Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para a mutação do gene <i>rpoB</i> em 27 amostras de pacientes com TB pulmonar paucibacilar.....	63
Tabela 9.	Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarros e de isolados de cultivos de <i>M. tuberculosis</i> , para detecção de mutações de genes <i>katG</i> ou <i>inhA</i> , de 69 pacientes de TB pulmonar multibacilar e paucibacilar.....	63
Tabela 10.	Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarro e de isolados de cultivos de <i>M. tuberculosis</i> , para detecção de mutações de genes <i>katG</i> ou <i>inhA</i> , de 42 pacientes de TB pulmonar multibacilar.....	64
Tabela 11.	Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarro e de isolados de cultivos de <i>M. tuberculosis</i> , para detecção de mutações de genes <i>katG</i> ou <i>inhA</i> , de 27 pacientes de TB pulmonar paucibacilar.....	64

Tabela 12.	Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarros e de isolados de cultivos de <i>M. tuberculosis</i> , para detecção de mutação do gene <i>rpoB</i> , de 69 pacientes de TB pulmonar multibacilar e paucibacilar.....	65
Tabela 13.	Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarros e de isolados de cultivos de <i>M. tuberculosis</i> , para detecção de mutação do gene <i>rpoB</i> , de 42 pacientes de TB pulmonar multibacilar.....	65
Tabela 14.	Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarros e de isolados de cultivos de <i>M. tuberculosis</i> , para detecção de mutação do gene <i>rpoB</i> , de 27 pacientes de TB pulmonar paucibacilar.....	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
anti-TB	Anti-Tuberculose
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BK	Bacilo de Koch
BACTEC 460 SISTEM	Becton Dickinson Diagnostic 460 Systems
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CTA/PNCT/MS	Comitê Técnico Assessor do Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
KNO₃	Nitrato de potássio
LJ	Löwenstein-Jensen
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MGIT 960	Mycobacteria Growth Indicator Tube 960
MNTB	Micobactérias não tuberculosas
MRN	Método da Redução de Nitrato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaNO₃	Nitrato de sódio
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
OK	Ogawa-Kudoh
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PCR-MAS	Reação da Polimerase em Cadeia Multiplex Alelo Específico
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
REMA	Ensaio de Microplaca com Resazurina
RNA	Ácido Ribonucleico
TB	Tuberculose
TBMR	Tuberculose Multirresistente
TBXDR	Tuberculose extensivamente resistente
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Aspecto gerais da Tuberculose	20
2.2	Epidemiologia	24
2.3	Tratamento da Tuberculose	27
2.4	Mecanismos de resistência aos fármacos	30
2.4.1	Rifampicina	32
2.4.2	Isoniazida	33
2.5	Testes de sensibilidade aos fármacos	34
2.6	Testes rápidos em Biologia molecular para a detecção de mutações associadas à resistência	37
2.6.1	INNO-LiPARif. TB	38
2.6.2	GenoType MTBDR plus	38
2.6.3	PCR em Tempo Real	39
2.6.4	Gene Xpert™ MTB/Rif	39
2.6.5	PCR Multiplex Alelo Específico (PCR-MAS)	40
3	OBJETIVO	43
3.1	Objetivo Geral	44
3.2	Objetivos específicos	44
4	DESCRIÇÃO METODOLÓGICA	45
4.1	Modelo de estudo	46
4.2	Aspectos Éticos e de Financiamento	46
4.3	Universo de Estudo	46
4.3.1	População de Referência	46
4.3.2	Pacientes e Critérios de Elegibilidade	47
4.3.3	Critérios de exclusão	48
4.4	Organização dos Experimentos	48
4.5	Procedimentos Micobacteriológicos	49
4.6	Identificação de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por PCR	49
4.7	Testes de Sensibilidade	50
4.8	Técnicas Moleculares para Determinação dos Genes de Resistência	51
4.8.1	Extração de DNA a Partir do Cultivo Micobacteriano	51
4.8.2	Extração de DNA a Partir da Amostra de Escarro	51
4.8.3	PCR Multiplex Alelo Específico (PCR-MAS)	52
4.9	Análises Estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Características dos pacientes de TB pulmonar incluídos no estudo	55
5.2	Análise de concordância entre a PCR-MAS e o Método de Redução de Nitrato (MRN)	58
5.3	Análise de concordância entre as PCR-MAS realizadas a partir de amostras de escarro e a partir de <i>M. tuberculosis</i> isolados de cultivo, para detecção de genes associados à resistência à Isoniazida e Rifampicina	63
6	DISCUSSÃO	66

7 CONCLUSÕES.....	72
8 REFERÊNCIAS.....	74
9 APÊNDICES.....	83
10 ANEXO.....	88

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa e continua sendo um problema de saúde global (WHO, 2012). O surgimento da TB multirresistente (TBMR), definida como uma doença causada por *Mycobacterium tuberculosis* com resistência à Rifampicina e Isoniazida, com ou sem resistência a outros fármacos antituberculose, representa uma importante ameaça ao controle da TB, pois dificulta o tratamento e aumenta o período de transmissão da doença (BRASIL, 2008; WHO, 2012). E para agravar a situação tem sido relatada a TB extensivamente resistente (TB-XDR), com *M. tuberculosis* detentor de resistência à Rifampicina, Isoniazida, a uma fluoroquinolona e a um medicamento injetável (Amicacina, Canamicina ou Capreomicina) (CDC, 2009).

A Isoniazida e a Rifampicina são medicamentos fundamentais no esquema de tratamento padrão da TB, e a resistência para esses medicamentos requer extensão da terapia (BANG et al., 2006). Estudos demonstram que a resistência à Rifampicina em cepas de *M. tuberculosis* pode ocorrer por mutações localizadas na região de 81 pares de bases (pb) do gene *rpoB* (MOKROUSOV et al., 2003). Na Isoniazida a resistência apresenta-se mais complexa, pois as mutações podem envolver vários genes, tais como: no *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, sendo que na sequência de DNA referente ao códon 315 do gene *katG*, é o mais frequente segundo estudos publicados (MAKROUSOV et al., 2003; YANG et al., 2005).

O método convencional para determinação de resistência à TBMR é baseado em testes de sensibilidade aos fármacos que envolvem o cultivo de *M. tuberculosis*. O método das proporções é considerado o padrão ouro, porém é necessário um período de até seis semanas para obtenção dos resultados (BRASIL, 2008). Para reduzir o tempo de liberação dos resultados de sensibilidade, algumas pesquisas propõem o Método da Redução de

Nitrato (MRN), pois apresenta desempenho equivalente ao método das proporções com liberação do resultado em até 2 semanas (ANGEBY et al., 2002; MUSA et al., 2005).

A detecção precoce de cepas resistentes é essencial para ajudar no controle do desenvolvimento e disseminação da TBMR, uma vez que permite a escolha da terapia mais adequada, reduzindo assim o custo do tratamento e a transmissão de bacilos resistentes (YANG et al., 2005). E a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência aos fármacos pode auxiliar na elaboração de metodologias para a detecção rápida dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes (ROSSETI et al., 2002).

Neste contexto, métodos moleculares alternativos, baseados na Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) têm sido desenvolvidos para detectar mutações em genes frequentemente associados à resistência aos principais fármacos utilizados no tratamento da TB. Vários métodos moleculares, já foram propostos o INNO-LiPA Rif. (ROSSAU et al., 1997; SOINI, 2001), o PCR em tempo real (VIEDMA et al., 2002), Gene Xpert™ MTB/Rif (BOEHME et al., 2010), GenoType MTBDR plus (HILLEMANN et al., 2007) e PCR Multiplex Alelo Específico (MOKROUSOV et al. 2002a; MOKROUSOV et al. 2003; YANG et al., 2005; ALLEGUI et al., 2012; VADWAI et al. 2012).

Dentre os métodos descritos, a técnica da PCR Multiplex Alelo Específico (PCR-MAS), que consiste de uma reação na qual estão presentes mais de um par de iniciadores (PERSUBN, 2010), pode ser considerada uma técnica de menor custo, menos laboriosa e que não utiliza equipamentos sofisticados em comparação a outros métodos moleculares. Fato que motivou a avaliação da PCR-MAS para a detecção de genes de *M. tuberculosis* associados à resistência a Rifampicina e Isoniazida, a partir de amostras clínicas de escarro. A PCR-MAS pode ser uma técnica viável para execução na rede pública de saúde, auxiliando no tratamento e controle da TB no estado do Amazonas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da Tuberculose (TB)

A TB é uma doença de caráter crônico, causada por micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, formado por: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis-BCG*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*. Deste complexo, a espécie *M. tuberculosis* é o principal agente causador da TB (BRASIL, 2008). É conhecido como bacilo de Koch (BK), em homenagem a Robert Koch, que o descobriu em 1882 (SAKULA, 1982).

As micobactérias são bacilos não capsulados, não esporulados, imóveis, com um comprimento de 2 a 5 µm, sensíveis ao calor e à luz solar, e resistentes ao frio (WAYNE; KUBICA, 1986). Apresentam parede celular, que é quimicamente complexa, sendo composta principalmente por três macromoléculas: peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácido micólico (Figura 1) (CRICK; MAHAPATRA; BRENNAN, 2001).

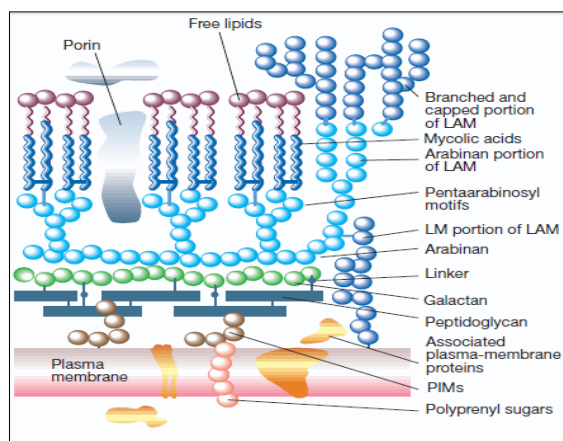


Figura 1: Estrutura da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

LAM= lipoarabinomanas; LM = lipomanas; PIM = manosídeos de fosfatidilinositol.

Fonte: Park; Bendelac (2000).

O peptidoglicano fica do lado externo da membrana celular e estabelece ligações covalentes com o arabinogalactano. Este último, por sua vez, liga-se também de forma covalente aos ácidos micólicos. Os ácidos micólicos são ácidos gordos de cadeia longa, com mais de 90 átomos de carbono, e são responsáveis pela álcool-ácido resistência (CRICK; MAHAPATRA; BRENNAN, 2001).

As micobactérias possuem a propriedade de reter um corante como a fucsina, mesmo após a tentativa de descoloração pelo uso de soluções álcool-ácidas. Por esse motivo as micobactérias são consideradas bacilos álcool-ácido resistentes, que na prática clínica e laboratorial são denominadas de BAAR (Figura 2) (BRASIL, 2008).

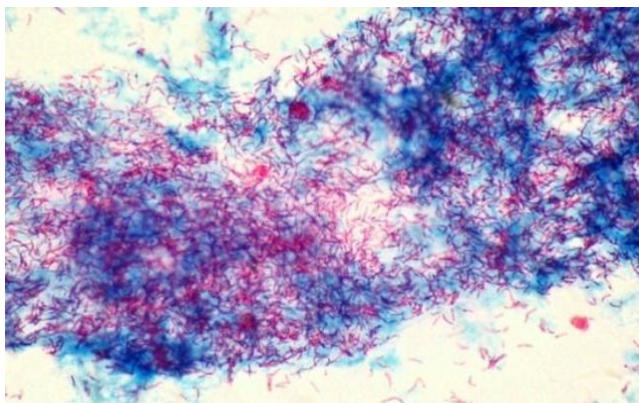


Figura 2: Bacilos álcool-ácido resistentes (coloração Kinyoun, aumento 100x).
Fonte: Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto (Laboratório de Micobacteriologia – INPA/UFAM).

A transmissão do bacilo da TB ocorre, principalmente, através do ar devido à contaminação do mesmo por gotículas de saliva produzidas durante a tosse, fala ou espirro de doentes ainda não diagnosticados e tratados (SCHLOSSBERG, 2005; WHO, 2009). Os principais sintomas da TB pulmonar são: tosse persistente, produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento (LAWN; ZUMLA, 2011). Além da forma pulmonar, a TB pode apresentar formas extrapulmonares,

cujos sinais e sintomas dependem dos órgãos e/ou sistemas acometidos. A ocorrência de formas extrapulmonares ou disseminadas é maior entre pacientes HIV positivos, com imunossupressão grave. As principais formas de TB extrapulmonar são: pleural, ganglionar, meningoencefálica, pericárdica e óssea (BRASIL, 2011).

Indivíduos que foram infectados por *M. tuberculosis* e não apresentam nenhuma doença de base e nem receberam tratamento preventivo para TB latente, tem um risco de 5 a 10% para desenvolverem a doença. Entretanto, o risco para progressão da doença aumenta substancialmente na presença de imunossupressão, tais como aquela causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pelo uso de medicamentos imunossupressores (CDC, 2000; CDC, 2009) (Figura 3).

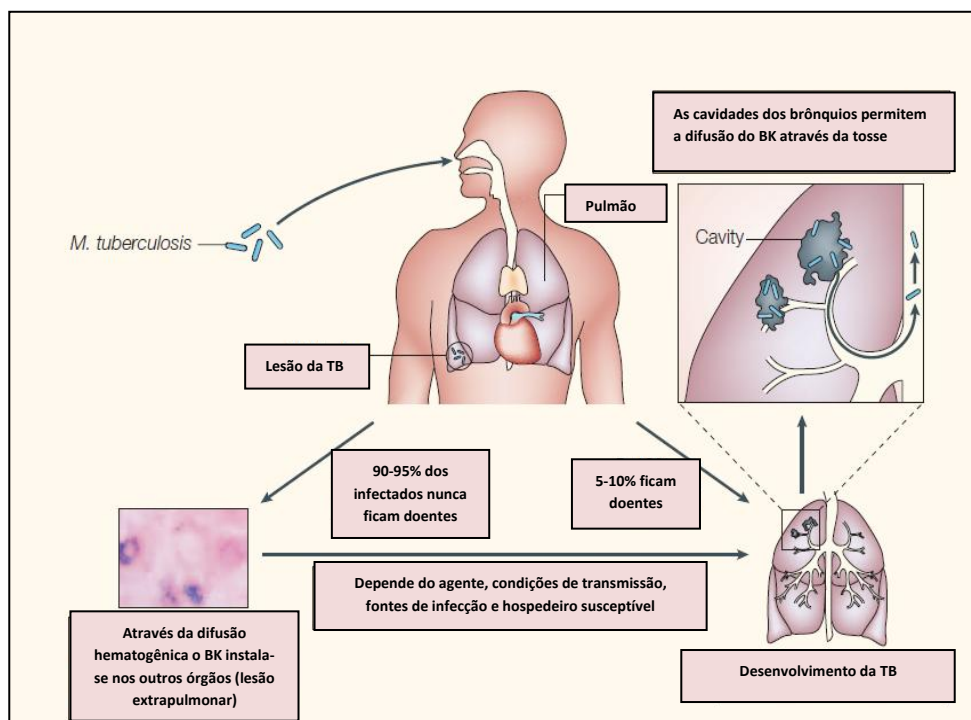


Figura 3: Fases de infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.
Fonte: Adaptado de Rook; Dheda; Zumla (2005).

O diagnóstico presuntivo da TB pulmonar faz-se através de dados da história clínica e achados radiológicos; a confirmação do diagnóstico é obtida através da baciloscopia e/ou cultura (FERREIRA et al., 2005). A baciloscopia do escarro, desde que executada corretamente em todas as suas etapas, permite detectar de 60% a 80% dos casos de TB pulmonar, o que é importante do ponto de vista epidemiológico, já que os casos bacilíferos são os responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão (BRASIL, 2011). A cultura, por sua vez, apresenta elevada especificidade e sensibilidade no diagnóstico da TB e pode aumentar em até 30% o diagnóstico da doença.

A cultura é solicitada quando há suspeita clínica e/ou radiológica de TB com baciloscopia repetidamente negativa, casos de retratamento, pacientes HIV positivos, populações vulneráveis, suspeitos de resistência e suspeita de TB extrapulmonar (SBPT, 2009). As unidades formadoras de colônias de *M. tuberculosis* crescem muito lentamente em meios de cultivo sólido e necessitam de até oito semanas de incubação em meios artificiais sólidos, sendo os mais usados aqueles a base de ovo como o Löwenstein-Jensen (LJ) e o Ogawa-Kudoh (OK) (BRASIL, 2008).

Devido ao avanço tecnológico surgiram os métodos semi-automatizados, utilizando meios líquidos que permitiram reduzir o tempo para a liberação dos resultados. Como por exemplo, o BACTEC® 460 SISTEM (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD), um sistema que detecta CO₂ radiomarcado liberado no meio pela replicação bacteriana, os resultados são liberados em 14 dias. E o MGIT 960, que contém um sensor fluorescente que reage às concentrações de oxigênio no meio de cultura, liberando os resultados em 13 dias (TORTOLI et al., 1999).

Além dos métodos automatizados de cultivo, métodos moleculares baseados na Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) têm sido amplamente desenvolvidos para o diagnóstico da TB. Esta técnica, que envolve a amplificação de segmentos do DNA do

bacilo, pode apresentar em torno de 65% de sensibilidade e especificidade superior a 90%, sendo possível ser realizada em algumas horas (FREITAS et al., 2009).

Recentemente, um novo teste de biologia molecular automatizado foi descrito, o Gene XpertTM MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA). Segundo o Boletim Brasileiro de Avaliação de tecnologia em Saúde (BRATS, 2011), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2009 e a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2010 recomendaram a sua utilização. Esse teste permite resultados da detecção do bacilo e do teste de sensibilidade à Rifampicina em 2 horas pela técnica PCR em tempo real (WHO, 2011a). Estudos para a validação desse novo teste molecular estão sendo conduzidos no Brasil (MELLO, 2012).

Nos laboratórios de diagnóstico devem ser usadas técnicas rápidas, sensíveis e específicas que conduzam rapidamente ao isolamento, à identificação do *M. tuberculosis* e à determinação do seu perfil de sensibilidade às drogas. A diminuição do tempo de espera do diagnóstico com certeza permite ao doente ser rapidamente submetido a um tratamento adequado, reduzindo a probabilidade de propagação da doença.

2.2. Epidemiologia

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a TB como uma emergência de saúde pública mundial, em que se estimavam 7 a 8 milhões de casos e 1,3 a 1,6 milhões de mortes a cada ano. Em 2011, houve cerca de 9 milhões de casos novos de TB e 1,4 milhões de mortes, destas 430 mil foram associadas com HIV-positivo (Figura 4) (WHO, 2012).

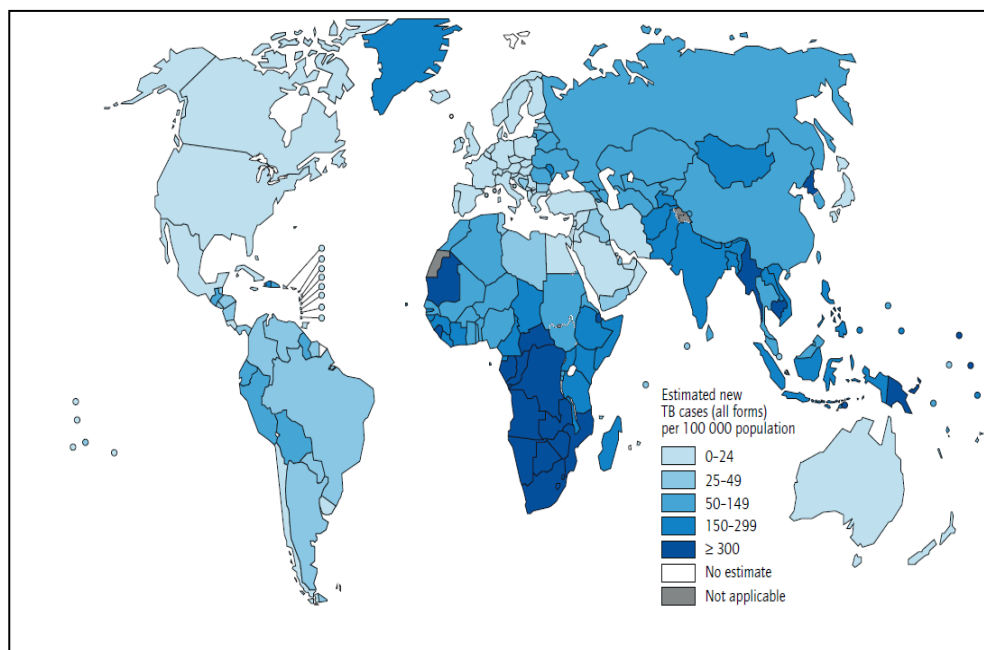


Figura 4: Taxa global de incidência de Tuberculose, estimado em 2011.
Fonte: World Health Organization (2012).

No Brasil a TB é um problema de saúde prioritário, sendo a 4ª causa de mortes por doenças infecciosas e a 1ª causa de mortes dos pacientes com HIV. Em 2012 foram notificados 70 mil casos novos, sendo o 17º país em número de casos e o 22º país em taxa de incidência, prevalência e mortalidade entre os 22 países de alta carga (BRASIL, 2013).

No Estado do Amazonas a TB é considerada endêmica, estando dentre as maiores taxas em incidência da doença no país, com 62,6/100.000 habitantes no ano de 2011 (BRASIL, 2012). Em Manaus, capital do Estado do Amazonas, o número de casos diagnosticados em 2011 foi de 1.603. Destes 1.322 casos foram de TB pulmonar, sendo 863 casos de multibacilares (baciloscopia direta positiva) e 459 casos de paucibacilares (baciloscopia direta negativa com cultivo positivo). O número de casos de abandono terapêutico entre os multibacilares foi de 11,4% (SEMSA, 2012).

Um fato preocupante tem sido o aumento da incidência dos casos de TB multirresistente (TBMR), resistência pelo menos à Rifampicina e à Isoniazida (CDC,

2009). Em 2011, foram notificados 630 mil casos de TBMR (BRASIL, 2012). Globalmente, são estimados para TBMR 3,7% (2,1% a 5,2%) em casos novos e 20,0% (13,0% a 26,0%) em casos previamente. Mais de 60% desses pacientes estavam na China, Índia, Rússia, Paquistão e África do Sul (WHO, 2012). No Brasil, em 2011 foram notificados 646 casos de TBMR (BRASIL, 2013) (Figura 5).

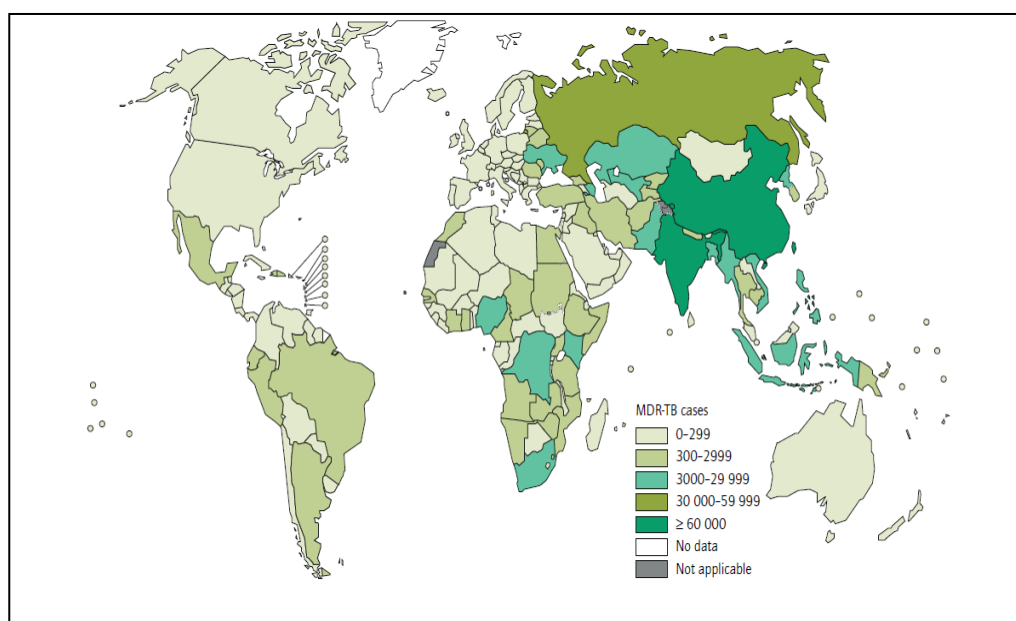


Figura 5: Números globais de casos de Tuberculose multirresistente.
Fonte: World Health Organization (2012).

Existe também, além da TB-MDR, a TB extensivamente resistente (TBXDR), é a resistência à Rifampicina e Isoniazida acrescida à resistência a uma Fluoroquinolona e a um medicamento injetável (Amicacina, Canamicina ou Capreomicina) (CDC, 2009; VADWAI et al., 2012). Um total de 84 países tem relatado casos de TB extensivamente resistente (TBXDR) (WHO, 2012).

As principais causas do aparecimento da resistência adquirida são: esquemas inadequados; uso irregular do esquema terapêutico por má adesão ou falta temporária dos medicamentos (BRASIL, 2011).

2.3.Tratamento da Tuberculose (TB)

A TB é uma doença curável em praticamente 100 % dos casos novos, sensíveis aos medicamentos anti-TB, desde que obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e a adequada operacionalização do tratamento (BRASIL, 2011).

A penicilina foi o primeiro antibiótico descrito na literatura usado para o tratamento da TB, no entanto sem muito sucesso. Posteriormente, a Estreptomicina começou ser utilizada atuando de maneira eficaz no combate ao bacilo de Koch. Após a Estreptomicina, novos fármacos foram sendo descobertos e utilizados com sucesso, dentre estes destacam-se a Isoniazida, a Rifampicina, o Etambutol e a Pirazinamida (DE SOUZA; VASCONCELOS, 2005).

Os fármacos utilizados no tratamento da TB podem ser divididos em duas categorias principais: os agentes de “primeira linha”, que combinam o maior nível de eficácia com um grau aceitável de toxicidade, nos quais se incluem: Isoniazida, Rifampicina, Etambutol, Estreptomicina e Pirazinamida (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006) (Figura 6).

Os agentes de “segunda linha” são: Moxifloxacino ou Gatifloxacino, Etionamida, Ácido Aminosalicílico, Ciclosserina, Amicacina, Canamicina, Capreomicina e a Linezolida (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

No Brasil, desde 1979, o Ministério da Saúde (MS), através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) propõe alguns esquemas de tratamento que são administrados conforme a clínica do paciente (SBPT, 2004).

Em 2009, o Comitê Técnico Assessor do Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde (CTA/PNCT/MS) emitiu uma nota técnica com modificações nos referidos esquemas de tratamento da TB, devido aos dados do II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos anti-TB, que apresentaram um aumento da resistência primária à Isoniazida de 4,4% para 6,0% e de 1,1% para 1,4% para Rifampicina (BRASIL, 2010).

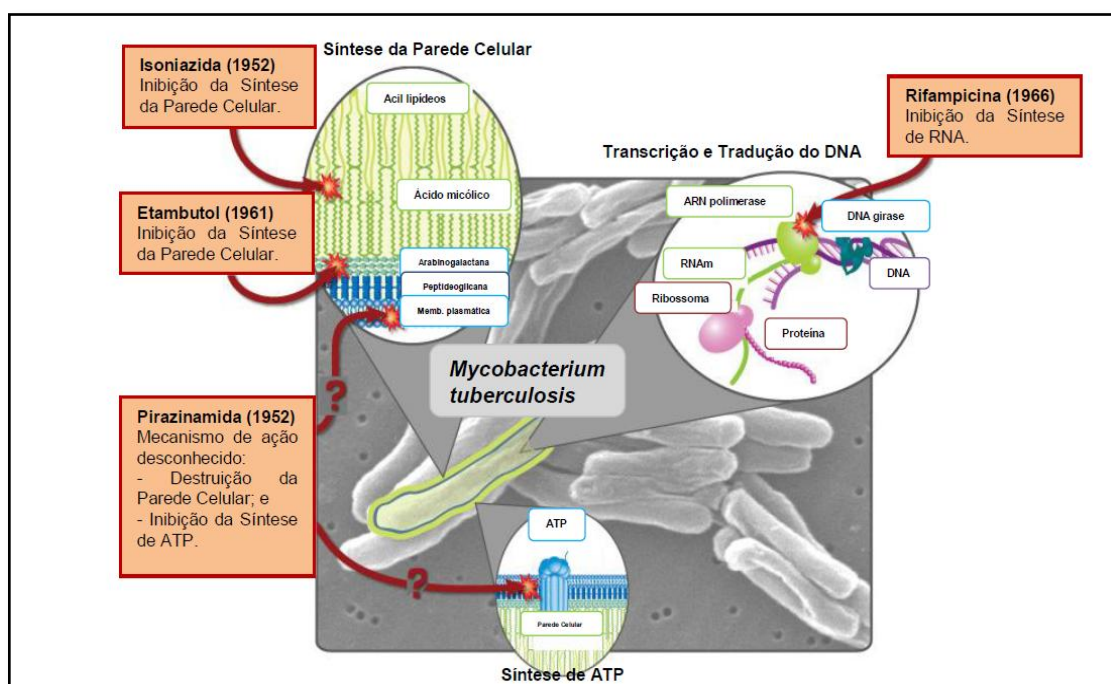


Figura 6: Esquema representativo dos mecanismos de ação dos fármacos de “primeira linha” utilizados no tratamento da TB.

Fonte: Adaptado de NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases).

As principais modificações referem-se: ao acréscimo do Etambutol ao esquema anterior composto por Rifampicina, Isoniazida e Pirazinamida; adotar a associação dos fármacos em forma de comprimidos, com doses fixas combinadas 4 em 1 (Rifampicina,

Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol) para a fase de tratamento intensivo, e 2 em 1 (Rifampicina e Isoniazida), para fase de manutenção; utilizar formulações de comprimidos em substituição às cápsulas; e adequar as doses de Isoniazida e Pirazinamida em adultos para 300 mg /dia e 1.600 mg /dia, respectivamente (SBPT, 2009).

O esquema básico é indicado para o tratamento dos casos novos de TB pulmonar e extrapulmonar (exceto meningoencefalite), bem como para todos os casos de recidiva e retorno após abandono (BRASIL, 2011) (Quadro 1).

Quadro 1: Esquema Básico de Tratamento da TB em adultos e adolescentes (2RHZE/4RH)

REGIME	FÁRMACOS	FAIXA DE PESO	DOSE	MESES
2 RHZE Fase Intensiva	RHZE 150/75/400/275mg comprimido em dose fixa combinada	20Kg a 35Kg	2 comprimidos	2
		36Kg 50Kg	3 comprimidos	
		>50Kg	4 comprimidos	
4 RH Fase de Manutenção	RH 150/75 mg comprimido	20 a 35Kg	2 comprimidos	4
		36Kg a 50Kg	3 comprimidos	
		> 50Kg	4 comprimidos	

R= Rifampicina; H= Isoniazida; Z= Pirazinamida; E= Etambutol

Fonte: NOTA TÉCNICA Nº 03/2013/CGPNCT/DEVIT/SVS/MS.

Para os casos de pacientes TBMR, o esquema padronizado é composto de cinco medicamentos: Estreptomicina, Etambutol, Ofloxacina, Pirazinamida e Terizidona na fase intensiva e três medicamentos: Etambutol, Ofloxacina e Terizidona na fase de manutenção. Destes medicamentos, a Estreptomicina deverá ser utilizada 5 dias por semana nos 2 primeiros meses, seguido de 3 vezes por semana nos 4 meses subsequentes. O regime de

tratamento deve ser supervisionado, com duração de 18 meses, e acompanhado em uma unidade de referência terciária (SBPT, 2009).

Os medicamentos para o tratamento da TB são dispensados através de protocolos de acordo com o peso do paciente e em crianças, abaixo de 10 anos, o esquema utilizado é Rifampicina, Isoniazida e Pirazinamida (BRASIL, 2010).

A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os princípios básicos para o tratamento, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos e, assim, assegurando a cura do paciente (BRASIL, 2011).

2.4 Mecanismos de resistência aos fármacos

O crescimento micobacteriano é lento e muitos desses microrganismos vivem, por um longo período, em estado de latência no hospedeiro. As principais barreiras a serem vencidas pelos agentes antimicrobianos no combate às micobactérias são: sua espessa parede celular, que inibe a penetração de muitos fármacos, e o fato de que uma quantidade desses microrganismos pode residir no interior dos macrófagos (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

No mecanismo de resistência do *M. tuberculosis*, não há indicação de uma transferência por plasmídeos ou transposons e o mecanismo de resistência são exclusivamente por mutações (ZHANG; YEW, 2009). O mecanismo clássico pelo qual a mutação confere resistência é aquele que ocorre no gene que codifica para o alvo da droga, diminuindo a habilidade desta se ligar à enzima (ROSSETI et al., 2002). No caso de micobactérias não causadoras de Tuberculose (MNT), a maioria apresenta resistência

natural a todos os fármacos, provavelmente devido à estrutura da parede celular, que serve como uma barreira. Devido a esses fatos, em estudos de resistência, a TB é considerada separadamente das outras micobacterioses (GILLESPIE, 2002).

Todos os bacilos que formam uma colônia, apesar de procederem de uma só célula, não têm um comportamento homogêneo frente aos fármacos anti-TB. Em toda a população de bacilos sensíveis existe uma pequena proporção de bacilos que sofreram mutações espontâneas e se comportam como resistentes a alguma das drogas (GILLESPIE, 2002).

A resistência aos fármacos antituberculose pode ser classificada em "resistência em casos novos", observada em pacientes com TB que nunca receberam fármacos específicos anteriores ao tratamento atual ou que receberam fármacos por menos de 1 mês. A "resistência em casos previamente tratados" é aquela observada em pacientes com TB que receberam tratamento específico por pelo menos 1 mês, cujos bacilos desenvolveram resistência a um ou mais fármacos (ESPINAL, 2003) A Rifampicina e a Isoniazida representam a espinha dorsal no tratamento quimioterápico contra *M. tuberculosis*, pois a resistência a essas duas drogas reduz a eficácia do tratamento padrão antituberculose para 77% (HERRERA-LEÓN et al., 2004). Segundo um estudo feito por Dalcolmo et al. (2007), a resistência em casos novos a estes dois fármacos ocorreu em 0,8% dos casos investigados, e a resistência em casos previamente tratados foi de 9,2%.

A ação dos dois principais medicamentos utilizados no esquema básico do tratamento da TB, bem como os principais aspectos sobre a resistência medicamentosa estão descritos a seguir:

2.4.1 Rifampicina

A Rifampicina foi descoberta em 1957, a partir do cultivo de uma cepa de *Streptomyces*, que foi denominada de *Streptomyces mediterranei*, isolada pela primeira vez de culturas obtidas de uma floresta de pinheiros, pelo Lepetit Research Laboratories perto de Nice, na França (RIEDER, 2002).

A Rifampicina foi introduzida no esquema terapêutico da TB a partir da década de 60 (SATO, 2003). Esse fármaco inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram-positivas e de muitos microrganismos Gram-negativos, sendo bactericida para microrganismos tanto intracelulares, quanto extracelulares (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006). Além do efeito bactericida sobre as bactérias metabolicamente ativas, o fármaco também possui uma ação esterilizante excelente frente às bactérias em estado de latência (QUIRÓS-ROLDÁN et al., 2001). A concentração inibitória mínima (CIM) da Rifampicina é 0,25 a 0,5 µg/mL em meio líquido (CARVALHO et al., 2007).

O mecanismo de ação da Rifampicina é inibir a RNA-polimerase, dependente de DNA nas células procarióticas, porém não nas eucarióticas (RIEDER, 2002). Isto ocorre pela ligação da Rifampicina à RNA-polimerase, a qual forma um complexo farmacoenzimático estável, inibindo a cadeia de formação da síntese de RNAm, mais especificamente, a subunidade beta dessa enzima (ZHANG; YEW, 2009) (Figura 5). A resistência à Rifampicina é causada por mutações localizadas na região de 81 pb do gene *rpoB* que codifica a cadeia beta da RNA polimerase, entre as sequências nucleotídicas 507-533 (MOKROUSOV et al., 2003; YANG et al., 2005).

2.4.2 Isoniazida

A Isoniazida ou hidrazida do ácido isonicotínico é um fármaco efetivo contra a TB e um dos principais quimioterápicos de primeira linha no tratamento da doença, sendo reconhecida, já em 1952, como potente agente contra *M. tuberculosis* (ROSSETI et al., 2002). Esse fármaco é bacteriostático para os bacilos com baixa multiplicação, mas é bactericida para os microrganismos que se multiplicam rapidamente (LUNA, 2001).

A Isoniazida age no *M. tuberculosis* por difusão passiva através da parede celular. Este fármaco é uma pró-droga e precisa ser ativada pela catalase–peroxidase (*katG*) do bacilo. A *katG* promove a remoção de dois elétrons da Isoniazida tornando-a num intermediário ativo (ZHANG; YEW, 2009). A forma ativa da droga inibe a atividade das proteínas enoil-(transportadora de acil) reductase (*inhA*) e a proteína β -cetoacil-(transportadora de acil) sintetase (*KasA*), que participam na síntese dos ácidos micólicos. Mais especificamente, a proteína *inhA* estabelece uma ligação no seu local ativo com o NAD(H), utilizando-o como co-factor. Por sua vez, a Isoniazida ativada liga-se covalentemente com o carbono 4 do NADH, do complexo *inhA*-NADH, na presença de oxigênio e magnésio (RATTAN; KALIA; AHMAD, 1998), ocorrendo a inibição da síntese de ácidos micólicos.

Ao contrário da resistência à Rifampicina em que a maioria das mutações se concentra em uma pequena faixa de um só gene, a resistência à Isoniazida é mais complexa, pois pode ocorrer por mutações em vários genes como *katG*, *inhA*, *kasA* e *ahpC*, sendo os mais importantes o *katG* (32 a 93% dos casos) e o *inhA* (de 15 a 25%) (MOKROUSOV et al., 2002b; BANG et al., 2006).

A principal mutação no gene *katG* é na posição 315, pela substituição do aminoácido Serina (AGC) por Treonina (ACC), com diminuição da ação catalase, o que resulta em resistência à Isoniazida (EVANS et al., 2008). A mutação do gene *inhA* modifica a enzima, que perde afinidade pelo NADH, resultando em resistência à Isoniazida. Existem outros genes, como *kasA*, *mabA*, *ndh* e a região intergênica *oxiR-ahpC* (alquilhidroperoxidorreductase), que é um intermediário tóxico da Isoniazida, porém não está bem estabelecida e necessita de outros estudos (SLAYDEN; LEE; BARRY, 2000).

O diagnóstico para resistência em casos novos ou em casos previamente tratados, aos fármacos utilizados no tratamento da TB, tem sido alvo de muitos estudos, sendo uma investigação fundamental para os programas de controle da doença.

2.5 Testes de sensibilidade aos fármacos

A avaliação da sensibilidade aos fármacos para *M. tuberculosis* pode ter três objetivos: escolher o esquema terapêutico no início do tratamento, avaliar se há desenvolvimento de resistência aos fármacos quando o doente não apresenta resposta ao tratamento, podendo ajudar na escolha de tratamentos alternativos, e estimar a prevalência da resistência em casos novos ou em casos previamente tratados na comunidade (CHAN; ISEMAN, 2002).

Os testes fenotípicos permitem determinar o perfil de sensibilidade das estirpes aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose. Para este fim, existem três métodos padronizados (BRASIL, 2011). O método das concentrações absolutas consiste na determinação da CIM, isto é, a mais baixa concentração de droga que consegue inibir o crescimento de um inóculo bacteriano padronizado. O método da razão de resistência, que

é uma variante do método descrito anteriormente e consiste em comparar a CIM da estirpe a testar com a CIM de uma estirpe padrão sensível (PALOMINO et al., 2008).

O método das proporções, originalmente descrito por Middlebrook e Cohn, em 1958, e modificado por Canetti et al., em 1963, considerado o padrão ouro pela OMS, é utilizado no Brasil, incorporando-se fármacos antituberculose utilizados no esquema terapêutico convencional ao meio de Löwenstein-Jensen (SATO, 2003). Este método consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes contidos em uma amostra clínica de pacientes, frente à determinada concentração de um fármaco capaz de inibir o desenvolvimento apenas das células sensíveis. Porém, é necessário um período de quatro a seis semanas para obtenção dos resultados (CANETTI et al., 1963).

Devido ao longo tempo para liberação do laudo de sensibilidade pelos métodos tradicionais, recentes pesquisas estão propondo a implantação de métodos alternativos e rápidos para a detecção de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos específicos, como métodos semi-automatizados utilizando meios líquidos e métodos moleculares.

O BACTEC 460 System é um sistema radiométrico semi-automatizado que utiliza meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 com ácido palmítico marcado pelo carbono 14. Este método tem a desvantagem de utilizar material radioativo (TORTOLI et al., 1999). Detecta a presença de micobactérias em espécimes clínicos, realiza testes de sensibilidade aos antimicrobianos e faz a diferenciação entre micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (OPLUSTIL et al., 2002).

Outro método semi-automatizado é o sistema MGIT 960, que permite a detecção do consumo de oxigênio das micobactérias, em tubos de ensaio contendo meio líquido *Middlebrook 7H9* e rutênio, metal que funciona como um sensor químico fluorescente.

Esta metodologia tem a vantagem de não ser radioativa, podendo-se obter um perfil de resistência aos fármacos em cerca de 13 dias (TORTOLI et al., 1999).

O método da redução de nitrato (MRN), que utiliza nitrato de potássio (KNO_3) como fonte de nitrato incorporado ao meio de Lowenstein-Jensen, é de execução mais simples quando comparado ao método das proporções. Este método é baseado na capacidade do *M. tuberculosis* reduzir o Nitrato a Nitrito durante o seu desenvolvimento. Assim, cepas resistentes se desenvolvem e reduzem o nitrato existente no meio de cultivo para a forma de nitrito, que após a adição de revelador propicia uma mudança de coloração do meio de cultivo. Essa indicação é constatada no 7º dia e reconfirmada ao 10º e 14º dia de desenvolvimento dos cultivos (ANGEBY et al., 2002).

Musa et al. (2005) avaliaram o MRN em amostras de escarro positivas, que foram concentradas e inoculadas no meio com nitrato, contendo diferentes antibióticos em cada tubo. Os resultados do antibiograma estavam disponíveis dentro de 14 dias. Este método, com inoculação direta de amostras de escarro, alcançou 100% de sensibilidade e especificidade para Rifampicina e 93% de sensibilidade e 100% de especificidade para Isoniazida.

Sanchonete et al. (2008), também realizaram um estudo, que avaliou o desempenho do MRN em meio sólido (NRA-LJ) e meio líquido (NRA-7H9), para determinar a sensibilidade frente aos fármacos antituberculose de primeira linha: Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Estreptomicina. O ensaio de microplaca com resazurina (REMA) foi utilizado como método de referência. Os três ensaios mostraram um alto nível de concordância para uma rápida detecção de resistência a Rifampicina e Isoniazida.

Martins (2010) realizou um estudo modificando o método da redução do nitrato (MRN), substituindo o nitrato de potássio (KNO_3) como fonte de nitrato incorporado ao meio sólido pelo nitrato de sódio ($NaNO_3$), obtendo resultados de total concordância com o método das proporções e com o MRN original para os fármacos Rifampicina, Isoniazida e Etambutol.

Apesar do bom desempenho do método da MRN e do baixo custo, ainda o tempo de espera é considerado longo, quando comparado a rapidez dos ensaios moleculares. Atualmente, está sendo testada uma variedade de métodos moleculares que buscam a detecção rápida isolados de bactérias sensíveis aos fármacos.

2.6 Testes rápidos em Biologia molecular para a detecção de mutações associadas à resistência

Os avanços em biologia molecular tornaram possível investigar os mecanismos genéticos da resistência aos fármacos, bem como caracterizar as mutações associadas à resistência aos diversos fármacos (ROSSETI et., 2002). Atualmente, está sendo testada uma variedade de métodos moleculares que buscam a detecção rápida de isolados de bactérias sensíveis aos fármacos. Muitos desses métodos são baseados na Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), que permite amplificar especificamente apenas as regiões dos genes envolvidas na resistência para posterior detecção de mutações (HERRERA-LEOÑ et al., 2005).

Dentre os métodos moleculares atualmente aplicados aos estudos de mutações destacam-se:

2.6.1 INNO-LiPA Rif. TB (Inno-genetics, Bélgica)

O kit comercial Inno-LiPARif. detecta especificamente a resistência à Rifampicina em *M. tuberculosis*. O teste é baseado no princípio de hibridização de fase sólida reversa e consiste na amplificação por PCR de um segmento do gene *rpoB*, desnaturação e hibridização dos amplicons com sondas imobilizadas em localizações conhecidas, sob condições rigidamente controladas (ROSSAU et al., 1997). O ensaio contém cinco sondas para a linhagem sensível, e quatro sondas para mutações específicas no gene *rpoB*. A interpretação do padrão de bandas permite a identificação do Complexo *M. tuberculosis* e a detecção das mutações no gene *rpoB*. O teste pode ser realizado em isolados a partir de cultura ou de espécimes clínicos, e seu tempo de realização é em torno de 48 horas. A concordância do Inno-LiPA Rif. com os testes de sensibilidade fenotípicos e com o sequenciamento é alta quando realizado a partir de cultura, variando de 92,2% a 99,0%. Este teste tem um custo extremamente elevado e não está disponível no Brasil (SOINI, 2001).

2.6.2 GenoType MTBDR plus

É outro ensaio disponível comercialmente, que o ensaio da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e hibridização reversa para a detecção de mutações mais comuns nos genes *rpoB* e *katG* em amostras de isolados de cultivos e também, diretamente em amostras de escarro positiva (HILLEMANN, et al., 2007; ANEK-VORAPONG et al., 2010). Em junho de 2008, a OMS aprovou este ensaio para ser utilizado na rotina de

laboratório em vários países. A maior desvantagem reside na necessidade de equipamentos e reagentes caros, além de profissional treinado em biologia molecular (HUYEN et al., 2010).

2.6.3 PCR em tempo real

As técnicas de PCR em tempo real permitem a análise imediata dos resultados devido ao acúmulo de fluorescência dos produtos do PCR durante a amplificação, não sendo necessária a sua manipulação pós-PCR. Podem ser usados diferentes formatos de reação que permitam monitorizar a formação dos produtos, assim como identificar a presença de mutações (VIEDMA et al., 2002). Comparativamente ao PCR convencional, as técnicas de PCR em tempo real são mais rápidas, sensíveis, reprodutíveis e reduzem o risco de contaminações pós-amplificação. Porém, são dispendiosas e por isso não são suportados por qualquer tipo de laboratório. Além disto, necessitam de pessoal especializado devido à existência de complexos equipamentos de PCR (VIEDMA, 2003).

2.6.4 Gene Xpert™ MTB/Rif

O teste Gene Xpert™ MTB/Rif. é um teste de amplificação de ácidos nucleicos utilizado para detecção do Complexo *M. tuberculosis* e para a triagem de resistência a Rifampicina. O teste consiste na amplificação de ácidos nucleicos por PCR em tempo real, e tem como principal benefício apresentado a integração e automatização de três processos (extração de DNA, amplificação e detecção de produtos da PCR) (BOEHME et

al., 2010). O Gene Xpert® MTB/RIF é atualmente único, pois utiliza um cartucho contendo todos os elementos necessários para a extração de DNA e PCR, incluindo reagentes liofilizados, tampões líquidos e soluções de lavagem (WHO, 2011). O teste pode fornecer resultados num laboratório local, em menos de 2 horas, sem necessitar de tratamento da amostra ou de recursos humanos especializados sem biologia molecular (VAN RIE et al., 2010).

Embora, o Gene Xpert™ MTB/Rif. tenha apresentado bom desempenho, o equipamento utilizado é de alto custo, e a aquisição dos insumos (reagentes) é condicionada as empresas que comercializam os kits. Por este motivo, o desenvolvimento ou padronização de técnicas moleculares mais simples, sem a exigência de equipamentos e insumos de alto custo e de fonte única, podem contribuir para rápida detecção de mutações associadas à resistência a Rifampicina e Isoniazida e, conseqüentemente, direcionar o tratamento mais adequado para TB.

2.6.5 PCR Multiplex Alelo Específico (PCR-MAS)

A PCR-MAS utiliza vários pares de iniciadores que atuam em regiões distintas dos mesmos ou diferentes genomas, isto permite a análise simultânea de múltiplos alvos de uma única amostra (PERSUBN, 2010). Como, por exemplo, em ensaios para detectar as mutações associadas à resistência aos fármacos da TB.

Estes ensaios utilizam em uma única PCR cinco pares de iniciadores alelos específicos, para produzir diferentes padrões de bandas de fragmentos de DNA, e detectar as mutações. No desenho dos iniciadores, o final 3' de cada iniciador alelo específico é

posicionado para parear com o nucleotídeo do respectivo códon da sequência da cepa *M. tuberculosis* H37Rv (sensível para todas as drogas). As mesmas posições onde os pontos de mutações mais frequentes foram relatados para as cepas resistentes. Desta maneira, quando não há mutação na sequência de DNA referente ao códon, o fragmento de DNA é amplificado. Pelo contrário, quando há mutação na sequência referente ao códon alvo, não há produto da PCR (YANG et al., 2005; CHIA et al, 2012).

Mokrousov et al. (2002a) adaptou a técnica da PCR-MAS, para detectar as mutações associadas à resistência ao Etambutol em amostras de cultivo de *M. tuberculosis*. Estes pesquisadores ainda investigaram as mutações que conferem resistência à Isoniazida no códon 315 do gene *katG*. No mesmo ano utilizaram a técnica para Rifampicina (MOKROUSOV et al., 2002b; MOKROUSOV et al., 2003).

Yang et al. (2005) otimizaram a técnica da PCR-MAS, para detectar simultaneamente as mutações associadas as resistências à Isoniazida (*katG* e *inhA*), Rifampicina (*rpoB*) e Etambutol (*embB*) a partir de cultivo de *M. tuberculosis*.

Allegui et al. (2012) utilizaram o PCR-MAS para detectar simultaneamente as mutações associadas as resistências à Isoniazida (códon 315 do gene *katG* na região promotora *mabA-inhA-15*) e Rifampicina (códon 516, 526 e 531 no gene *rpoB*). O ensaio mostrou uma especificidade de 100% para detecção de resistência as drogas e sensibilidade de 92,6% e 88,6% para Rifampicina e Isoniazida, respectivamente. Vadwai et al. (2012) aperfeiçoaram a técnica para detectar simultaneamente as mutações associadas à resistência à Rifampicina e Isoniazida (TB multirresistente) e à fluoroquinolona e aminoglicosídeos (TB extensivamente resistente).

A PCR-MAS fornece uma resposta rápida, de fácil interpretação e potencialmente mais eficiente para a detecção simultânea de mutações associadas a resistência aos fármacos anti-tuberculose. Neste estudo, a PCR-MAS foi aplicada em amostras de escarro, pois a maioria dos métodos para a determinação de sensibilidade aos fármacos utilizam isolados de *M. Tuberculosis* obtidos a partir de cultivo.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar o desempenho do método molecular PCR multiplex alelo específico (PCR-MAS) na detecção de genes associados à resistência à Isoniazida e à Rifampicina, em amostras de escarros de pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Verificar se o método molecular executado diretamente nas amostras de escarros proporciona acuidade comparável ao método da Redução de Nitrato para análise da sensibilidade aos fármacos.

3.2.2 Verificar a concordância da PCR-MAS, a partir de amostras escarros e de isolados de cultivo de *M. tuberculosis*, para detecção de genes associados à resistência a Isoniazida e Rifampicina.

3.2.3 Analisar a prevalência de resistência aos medicamentos do esquema básico antituberculose em pacientes de TB pulmonar multibacilar e TB pulmonar paucibacilar.

4. DESCRIÇÃO METODOLÓGICA

4. DESCRIÇÃO METODOLÓGICA

4.1 Modelo de Estudo

Estudo laboratorial do tipo prospectivo, experimental, que visou avaliar a técnica molecular PCR Multiplex Alelo Específico (PCR-MAS) para detecção rápida de mutações genéticas associadas à resistência a Rifampicina e Isoniazida, a partir de escarro de pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar.

4.2 Aspectos Éticos e de Financiamento

O presente estudo teve o apoio financeiro do projeto PPSUS/2009 – FAPEAM, coordenado pelo pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Doutor Mauricio Morishi Ogusku e co-orientador do presente trabalho. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da UFAM, em 31 de agosto 2011, com número CAAE: 0343.0.115.000-1(Anexo, 10).

4.3 Universo de Estudo

4.3.1 População de Referência

A população foi composta por pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar com baciloscopia positiva ou negativa, mas com cultura positiva para *Mycobacterium tuberculosis*. Foram incluídos pacientes de TB de primeira vez (sem tratamento anterior para TB), os com recidiva e os que abandonaram o tratamento. Estes pacientes residem em Manaus-AM e foram atendidos na Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes, que é referência Estadual em TB e atende a demanda de pacientes

sintomáticos respiratórios e com suspeita de TB oriundos de quatro distritos sanitários (norte, sul, leste e oeste) de Manaus.

4.3.2 Pacientes e Critérios de Elegibilidade

A amostra foi estimada com base no número de pacientes diagnosticados com TB pulmonar, BAAR positivo em Manaus-AM (863 casos), e que abandonaram o tratamento no ano de 2011, segundo os dados do Departamento de Vigilância Epidemiológica e Ambiental da Secretaria Municipal de Saúde (SEMSA, 2012).

Para o cálculo foi considerado o número de 98 casos de abandono ao tratamento para TB/ano 11,4%. Considerando que as coletas das amostras seriam realizadas no período de seis meses consecutivos, o número estimado foi de 49 casos de abandono/recidiva. Além disso, para este mesmo período foram incluídos 10% dos casos de TB pulmonar com tratamento de primeira vez, que corresponderia a 43 casos. No total foi previsto a inclusão de 92 casos de TB pulmonar para o presente estudo.

O número total de participantes do estudo foi estimado em 110 pessoas, de ambos os gêneros, com idades entre 18 e 60 anos, e não pertencentes à etnia indígena.

Para os controles negativos, foram testados 20% (n=18) do total de casos estimados para TB pulmonar. Estes controles foram pessoas com amostras de escarros negativos para TB pulmonar.

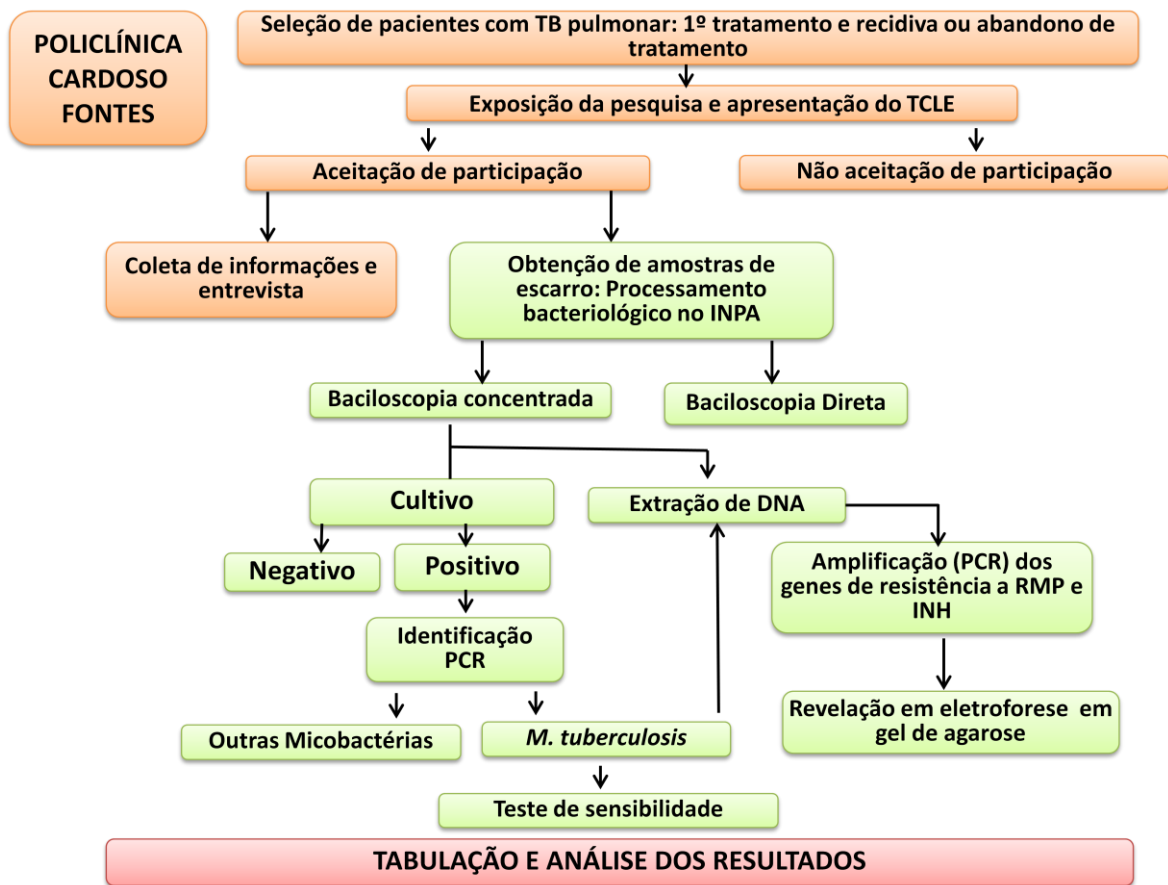
4.3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes de TB com cultivo de escarro negativo para o complexo *M. tuberculosis* e aqueles positivos para micobactérias não causadoras de TB

(MNT). Foram excluídos também os pacientes com cultivos contaminados por outros microrganismos.

4.4 Organização dos Experimentos

O fluxo dos procedimentos que foram realizados encontra-se ilustrado na Figura 7.



INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Figura 7: Fluxograma das atividades

4.5 Procedimentos Micobacteriológicos

A partir da amostra de escarro foram realizadas a baciloscopia direta e pós-concentração, e na sequência o cultivo pela técnica de PKO. As técnicas foram realizadas de acordo com o padronizado por Salem et al. (1990) e por Salem et al. (2007). Alíquotas de escarros, após serem processadas para o cultivo, foram armazenadas a -20°C até a extração de DNA.

4.6 Identificação de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR

As micobactérias que se desenvolveram nos cultivos tiveram o DNA extraído (vide protocolo item 4.8.1) e foram identificadas como *M. tuberculosis* por PCR com oligonucleotídeos específicos para o complexo *M. tuberculosis*. Neste ensaio um fragmento de 245 pares de bases (pb) da sequência de inserção IS6110 foi amplificado por PCR com oligonucleotídeos INS-1 (5'-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3') e INS-2 (5'-GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3'), de acordo com Hermans et al. (1990) e Van Embden et al. (1993). No Quadro 2 estão descritos os parâmetros de amplificação utilizados neste ensaio.

Quadro 2: Parâmetros de amplificação para a PCR - IS6110

Temperatura (°C)	Tempo (minutos:segundos)	Ciclo(s)
94	4:00	1
94	1:00	35
66	1:00	
72	1:00	
72	5:00	1
4	∞	1

Os produtos de PCR foram observados após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR Green, em transiluminador de luz azul.

4.7 Testes de Sensibilidade

O teste de sensibilidade aos fármacos foi realizado pelo Método da Redução de Nitrato em meio de Löwenstein-Jensen com NaNO_3 . O Método da Redução de Nitrato foi realizado conforme a técnica estipulada por Ängeby et al. (2002) com adaptação, de acordo com Martins (2010). No protocolo original utiliza-se KNO_3 (Nitrato de Potássio) como fonte de nitrato incorporado ao meio de Löwenstein-Jensen, mas para este estudo o KNO_3 foi substituído por NaNO_3 (Nitrato de Sódio). A leitura e interpretação do método da Redução de Nitrato foram baseadas na mudança de coloração do meio de cultivo de verde para rosa, indicando que houve redução de nitrato a nitrito, devido ao desenvolvimento de *M. tuberculosis*. Cada amostra processada tinha um tubo controle (sem o fármaco de interesse) e o tubo contendo o fármaco. A leitura para confirmação de resistência foi feita comparativamente com a do tubo controle. Assim, foi considerada como cepa resistente ao fármaco testado, aquela em que o meio de cultivo (contendo o fármaco) apresentou uma coloração mais forte que a do tubo controle testado, ou seja, rosa forte, vermelho intenso ou violeta. Para os tubos que não apresentarem mudança de coloração foi inicialmente o indicativo de sensibilidade ao fármaco testado.

Os resultados dos testes de sensibilidade, pelo Método de Redução de Nitrato foram encaminhados a Policlínica Cardoso Fontes, independente do resultado, para que o

tratamento adequado pudesse ser instituído aos pacientes portadores ou não de isolados resistentes a Rifampicina e/ou Isoniazida.

4.8 Técnicas Moleculares para Determinação dos Genes de Resistência

4.8.1 Extração de DNA a Partir do Cultivo Micobacteriano

O protocolo de extração foi realizado segundo Leão et al. (2004). Uma pequena porção da colônia de micobactéria, foi colhida com uma alça bacteriológica estéril descartável, ressuspensa em 1 mL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) e inativada por 60 minutos a 90°C (tempo e temperatura adaptados para o protocolo deste estudo) (OGUSKU, 2012). Após a inativação, a suspensão de micobactéria foi centrifugada a 12000 x g por 10 minutos e o sedimento ressuspensa em 200 µL de tampão TET (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1mM EDTA; 1% Triton X-100). Esta nova suspensão foi incubada a 100°C por 10 minutos e armazenada a -20°C por 24 horas. Posteriormente, a mesma foi centrifugada a 12000 x g por 30 segundos, e 5 µL (com concentração de 20 a 200 ng de DNA) do sobrenadante foi usado para amplificação de DNA (PCR-MAS).

4.8.2 Extração de DNA a Partir da Amostra de Escarro

As amostras de escarro tiveram o DNA extraído conforme protocolo de Ogusku et al. (2003). Uma alíquota de 200 µL de escarro processado pela técnica de PKO e armazenada a -20°C foi descongelada a temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensa em 200 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 0,1 mM EDTA). A centrifugação foi repetida e o

sobrenadante descartado. Ao sedimento foi adicionado um volume de 250 µL de tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 1% Tween 20; 1% Triton X-100; 800 µg/mL de Proteinase K). A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada a 56°C por um pernoite. Posteriormente, a amostra foi incubada a 100°C por 10 minutos e imediatamente a seguir acondicionada em banho de gelo por 2 minutos. Logo após foi submetida sucessivamente e por 3 vezes, intercalando períodos de 2 minutos a 100°C e 2 minutos em banho de gelo. A purificação de DNA foi realizada de acordo com Pierre et al. (1991) e Ogusku et al. (2003).

4.8.3 PCR Multiplex Alelo Específico (PCR-MAS)

A PCR-MAS teve como alvos as sequências de DNA referentes aos códons 315 do gene *katG*, os códons 516, 526 e 531 do gene *rpoB* e a posição -15 da região promotora do gene *mabA-inhA*. Os oito oligonucleotídeos alelos específicos correspondentes aos cinco códons alvos estão demonstrados na Tabela 1. As sequências dos oligonucleotídeos foram obtidos dos estudos realizados por Yang et al. (2005) e Mokrousov et al. (2002b).

Tabela 1: Oligonucleotídeos para PCR-MAS para detecção de mutações em *M. tuberculosis* associadas às resistências para Rifampicina e Isoniazida.

Alvos	Oligonucleotídeos alelos específicos (5' – 3')		Oligonucleotídeos pareados		Tamanho produto de PCR (pares de bases)
<i>katG</i> 315*	katG5R	ATACGACCTCGATGCCGC	katGOF	GCAGATGGGGCTGATCTACG	292
<i>mabA-inhA</i> :-15	InhAP-15	GCGCGGTCAGTTCCACA	inhAPF2	CACCCCGACAACCTATCG	270
<i>rpoB</i> 516	rpoB516	CAGCTGAGCCAATTCATGGA	RIRm	TTGACCCGCGCGTACAC	218
<i>rpoB</i> 526	rpoB526	CTGTCCGGGTTGACCCA			185
<i>rpoB</i> 531	rpoB531	CACAAGCGCCGACTGTC			170

Fonte: Yang et al. 2005; *Mokrousov et al., 2002b.

A PCR-MAS para cada amostra de escarro foi realizada em duas reações:

Protocolo PCR-MAS (Reação 1): tampão de PCR 1X, 200 μ M dNTP, 2 mM $MgCl_2$, oligonucleotídeos katGOF (0,1 μ M), katG5R (0,1 μ M), inhAP-15 (0,1 μ M), inhAPF (0,1 μ M), rpoB531 (0,2 μ M), RIRm (0,2 μ M), 1,3% DMSO, 1,3 M betaína, 2U Platinum® Taq DNA polimerase, 5 μ L de DNA, em um volume final de 25 μ L.

Protocolo PCR-MAS (Reação 2): esta reação teve a mesma concentração de reagentes da Reação 1, exceto para os seguintes componentes: 1,5 mM $MgCl_2$ e oligonucleotídeos rpoB516 (0,1 μ M), rpoB526 (0,2 μ M), RIRm (0,3 μ M).

Os parâmetros de amplificação foram obtidos a partir do trabalho de Ogusku et al. (2009) (Quadro 3).

Quadro 3: Parâmetros de amplificação para PCR-MAS.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos:segundos)	Ciclos
96	3:00	1
95	0:30	20
68 → 48*	0:50	
72	1:00	
94	0:30	25
53	0:50	
72	1:00	
72	5:00	1
4	∞	1

* Touchdown - A cada ciclo há redução de 1°C.

Os produtos de PCR foram observados após eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com SYBR Green, em transiluminador de luz azul.

4.9 Análises Estatísticas

Para comparação dos resultados obtidos pelo Método da Redução de Nitrato e pelo Método Molecular foi utilizado o índice *kappa*, de concordância. Além disso, foi realizado o teste de co-negatividade e co-positividade. Foi realizada também a análise de associação entre as mutações dos genes *katG*, *inhA* para resistência à Isoniazida e *rpoB* para resistência à Rifampicina, utilizando o teste exato de Fisher. O programa utilizado para as análises foi o BioEstat Versão 5.0 (AYRES et al., 2007). O nível de significância adotado foi de $\alpha = 5\%$.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Para este estudo, 135 amostras de escarro foram obtidas de pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar. Dessas amostras, foi possível isolar por cultivo 86 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, das quais 42 foram oriundas de pacientes de TB pulmonar multibacilar e 44 de paucibacilar. Além disso, 18 amostras de escarros de pessoas saudáveis foram testadas como controle negativo para os testes realizados neste estudo.

Das amostras excluídas, 41 foram negativas no cultivo, 3 foram positivas para micobactérias não causadoras de TB (MNT) e 5 tiveram os cultivos contaminados por outros microrganismos.

5.1. Características dos pacientes de TB pulmonar incluídos no estudo.

As características gerais dos 86 pacientes de TB pulmonar, dos quais as amostras foram avaliadas neste estudo, estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Características gerais dos pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar multibacilar e paucibacilar, com cultivo positivo para *Mycobacterium tuberculosis*.

Característica	Pacientes de TB multibacilar (n=42)	Pacientes TB paucibacilar (n=44)
Idade (anos) (Média e Desvio padrão)	35±10	33±10
Tabagismo (%) :		
Sim	28,6	19,4
Não	71,4	80,6
Vacina BCG (%)		
Sim	62,8	38,9
Não	2,8	11,1
Não sabe informar	31,4	50,0
Gênero (%) :		
Masculino	61,9	52,2
Feminino	38,1	47,8
Naturalidade (%)		
Manaus	44,1	44,4
Outros municípios do Amazonas	32,4	44,4
Outros estados	23,5	11,2
Situação do paciente (%)		
Primeiro tratamento	69,1	84,1
Retratamento por Abandono	11,9	4,5
Retratamento por Recidiva	19,0	11,4

Dos isolados de *M. tuberculosis* submetidos aos testes de sensibilidade pelo Método da Redução do Nitrato, oriundos de amostras de pacientes de TB multibacilares, 16,7% foram resistentes à Isoniazida, 2,4% à Rifampicina e 7,1% a ambos os fármacos. Entre os isolados, de *M. tuberculosis*, oriundos de amostras de pacientes de TB paucibacilares, 13,6% foram resistentes a Isoniazida, 2,3% à Rifampicina e 4,5% a ambos os fármacos (Figura 8).

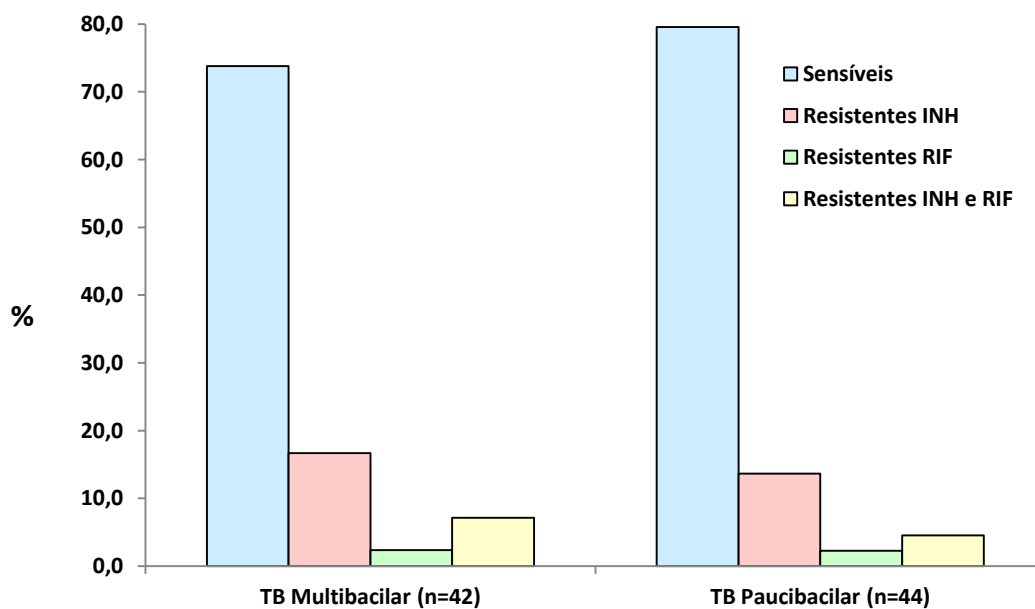


Figura 8: Percentual de resistência dos isolados de *M. tuberculosis* em pacientes multibacilares e paucibacilares.

No presente estudo, a maioria dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes a Isoniazida e/ou Rifampicina foi observada entre os pacientes de TB que estavam iniciando o tratamento pela primeira vez, ou seja, 19,0% nos pacientes de TB multibacilares e 15,9% nos pacientes paucibacilares (Figura 9).

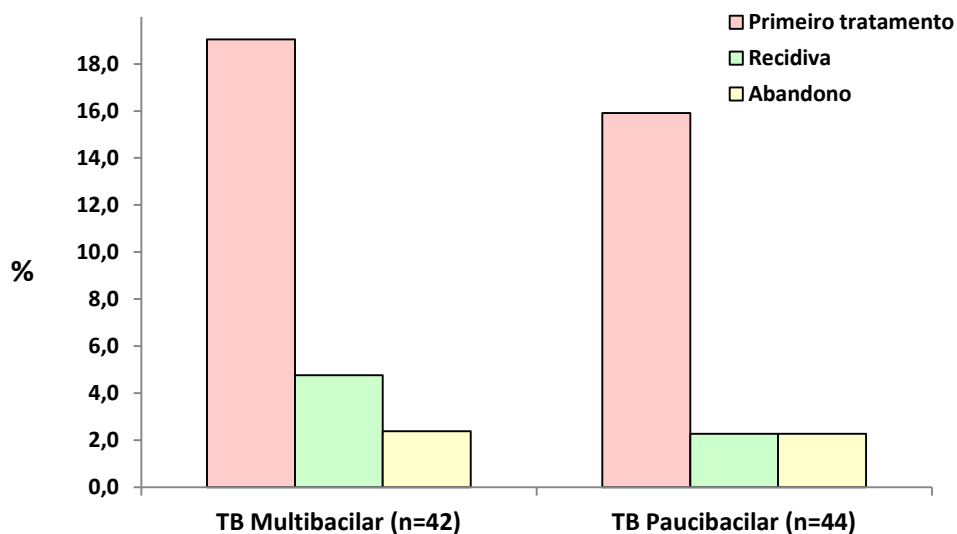


Figura 9: Distribuição da condição dos pacientes de TB que apresentaram isolados de *M. tuberculosis* resistentes a Isoniazida e/ou Rifampicina.

5.2 Análise de concordância entre a PCR Multiplex Alelo Específico (PCR-MAS) e o Método de Redução de Nitrato (MRN).

As amostras de escarros, que proporcionaram o isolamento de *M. tuberculosis*, tiveram os DNA extraídos e submetidos aos ensaios de PCR-MAS (Figura 10). Em 17 amostras de escarros não foi possível obter resultados nos ensaios de PCR-MAS pelo fato de apresentarem uma baixa concentração de bacilos (TB paucibacilar). Assim, a análise de concordância entre a PCR-MAS e MRN foi efetivamente realizada em 69 amostras de escarros.

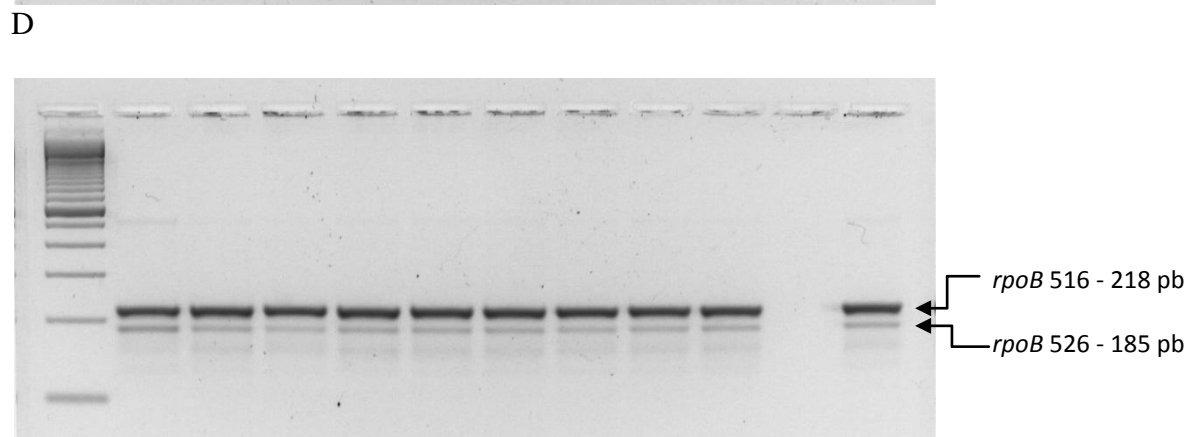
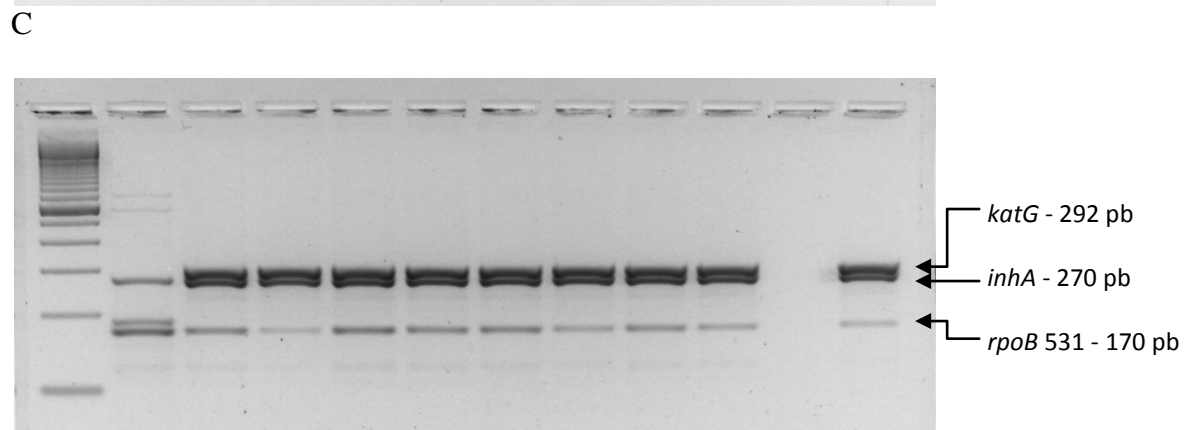
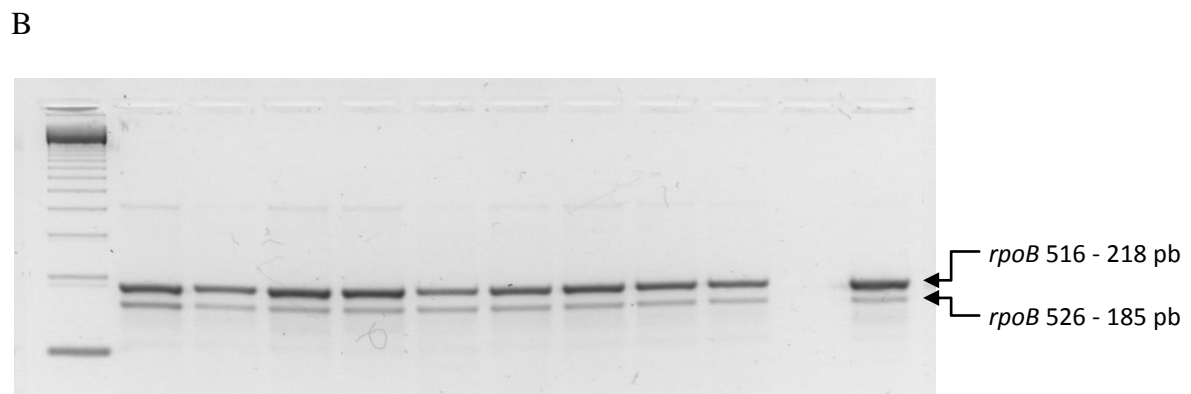
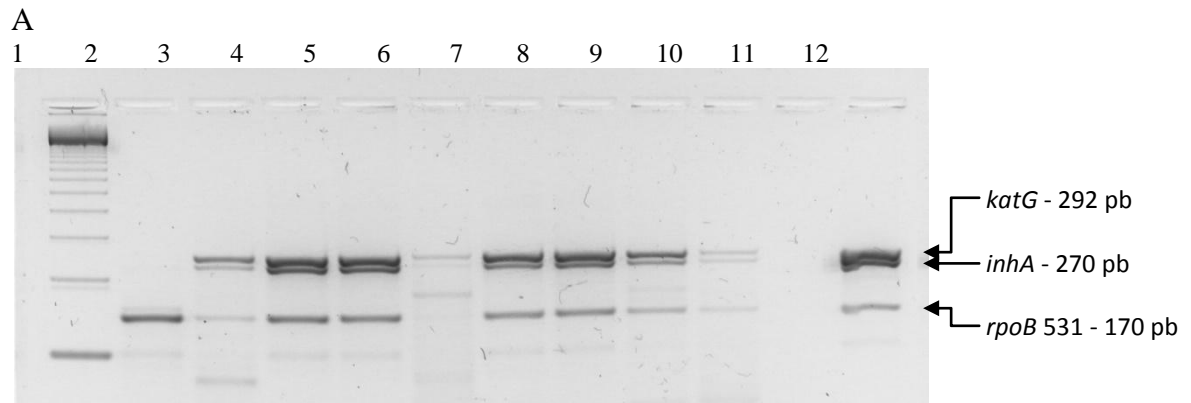


Figura 10: A e B: PCR-MAS a partir de amostras de escarro. C e D: PCR-MAS a partir de cultivo de *M. tuberculosis*. Linha 1: Ladder 100 pb; Linha 2: amostra 052/10; Linha 3: 053/10; Linha 4: 054/10; Linha 5: 076/10; Linha 6: 077/10; Linha 7: 082/10; Linha 8: 083/10; Linha 9: 084/10; Linha 10: 085/10; Linha 11: controle negativo (sem DNA); Linha 12: controle positivo (DNA *M. tuberculosis* H37Rv)

Dos 69 isolados de *M. tuberculosis*, 18 foram resistentes à Isoniazida no MRN. Os DNA das respectivas amostras de escarro foram submetidas ao PCR-MAS, sendo que 12 amostras apresentaram as mutações de *katG* ou *inhA*. Destas, apenas 4 tiveram concordância com resistência à Isoniazida pelo Método de Redução de Nitrato (Tabela 3). Demonstrando assim, uma fraca concordância da PCR-MAS com o MRN. Além disso, o resultado do teste exato de Fisher não foi significativo ($p= 0,7183$). Estes resultados indicam que as mutações gênicas nas regiões do *katG* ou *inhA* não devem estar associadas à resistência para Isoniazida, pelo menos nas amostras analisadas no presente estudo.

Tabela 3: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para as mutações dos genes *KatG* ou *InhA*, em 69 amostras de pacientes com TB pulmonar multibacilar e paucibacilar.

PCR-MAS (escarro multi e paucibacilar)	Método de Redução de Nitrato		Total
	Resistente INH (%)	Sensível INH (%)	
Mutação dos genes <i>katG</i> ou <i>inhA</i>	4 (22,2)	8 (15,7)	12 (17,4)
Ausência de Mutação	14 (77,8)	43 (84,3)	57 (82,6)
Total	18 (100,0)	51 (100,0)	69 (100,0)

INH –Isoniazida; Índice $kappa= 0,0733$; Replicabilidade=Fraca; Co-Positividade = 22,2%; Co-Negatividade = 84,3%; Teste exato de Fisher $p = 0,7183$

Análises de concordância e de associação, dos resultados observados no MNR e na PCR-MAS, respectivamente, para a sensibilidade à Isoniazida e mutações gênicas de *katG* ou *inhA*, também foram realizadas separadamente, para as amostras oriundas de pacientes com TB multibacilar ($n = 42$) (Tabela 4) e TB paucibacilar ($n = 27$) (Tabela 5), mas não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 4: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para as mutações dos genes *katG* ou *inhA* em 42 amostras de pacientes com TB pulmonar multibacilar.

PCR-MAS (escarro multibacilar)	Método de Redução de Nitrato		Total
	Resistente INH (%)	Sensível INH (%)	
Mutação dos genes <i>katG</i> ou <i>inhA</i>	2 (20,0)	5 (15,6)	7 (16,7%)
Ausência de Mutação	8 (80,0)	27 (84,4)	35 (83,3%)
Total	10 (100,0)	32 (100,0)	42 (100,0)

INH – Isoniazida; Índice $kappa= 0,0488$; Replicabilidade=Fraca; Co-Positividade = 20,0%; Co-Negatividade = 84,4%; Teste Exato de Fisher $p = 0,9951$

Tabela 5: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para as mutações dos genes *katG* ou *inhA* em 27 amostras de pacientes com TB pulmonar paucibacilar.

PCR-MAS (escarro paucibacilar)	Método de Redução de Nitrato		Total
	Resistente INH (%)	Sensível INH (%)	
Mutação dos genes <i>katG</i> ou <i>inhA</i>	2 (25,0)	3 (15,8)	5 (18,5%)
Ausência de Mutação	6 (75,0)	16 (84,2)	22 (81,5%)
Total	8 (100,0)	19 (100,0)	27 (100,0)

INH – Isoniazida; Índice $kappa= 0,1033$; Replicabilidade=Fraca; Co-Positividade = 25,0%; Co-Negatividade = 84,2%; Teste exato de Fisher $p = 0,6152$

Dos 69 isolados de *M. tuberculosis* testados para a sensibilidade à Rifampicina pelo MRN, 6 foram resistentes. Pela PCR-MAS, nas respectivas amostras de escarros, em 4 amostras foi possível detectar a mutação para o gene *rpoB*, indicando que a mutação deste gene pode estar associada à resistência para Rifampicina ($p = 0,0177$). No entanto, 11 amostras apresentaram a mutação no gene *rpoB* e foram sensíveis à Rifampicina (Tabela 6). Por este motivo, a concordância foi fraca entre a PCR-MAS e o MRN, quando analisadas amostras multibacilares e paucibacilares conjuntamente.

Tabela 6: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para a mutação do gene *rpoB* em 69 amostras de pacientes com TB pulmonar multibacilar e paucibacilar.

PCR-MAS (escarro múltiplo e paucibacilar)	Método de Redução de Nitrato		Total
	Resistente RIF (%)	Sensível RIF (%)	
Mutação do gene <i>rpoB</i>	4 (66,7)	11 (17,5)	15 (21,7)
Ausência de Mutação	2 (33,3)	52 (82,5)	54 (78,3)
Total	6 (100,0)	63 (100,0)	69 (100,0)

RIF – Rifampicina; Índice $kappa= 0,2931$; Replicabilidade=Fraca; Co-Positividade = 66,7%; Co-Negatividade = 82,5%; Teste exato de Fisher $p = 0,0177$

Dos 4 isolados de *M. tuberculosis* de pacientes de TB multibacilar e resistentes à Rifampicina, em 3 das respectivas amostras de escarro foi possível detectar a do gene *rpoB* (Tabela 7), resultando em uma boa concordância entre a PCR-MAS e o MRN (Índice $kappa = 0,7237$). Além disso, houve associação significativa da presença de mutação do gene *rpoB* com a resistência à Rifampicina ($p= 0,0014$).

A comparação dos resultados obtidos nos pacientes de TB paucibacilar (Tabela 8), evidenciou fraca concordância entre a PCR-MAS e o MNR e nenhuma associação da mutação gênica do *rpoB* à resistência para Rifampicina.

Tabela 7: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para a mutação do gene *rpoB* em 42 amostras de pacientes com TB pulmonar multibacilar.

PCR-MAS (escarro multibacilar)	Método de Redução de Nitrato		Total
	Resistente RIF (%)	Sensível RIF (%)	
Mutação do gene <i>rpoB</i>	3 (75,0)	1 (2,6)	4 (9,5)
Ausência de Mutação	1 (25,0)	37 (97,4)	38 (90,5)
Total	4 (100,0)	38 (100,0)	42 (100,0)

RIF – Rifampicina; Índice $kappa= 0,7237$; Replicabilidade= Boa; Co-Positividade = 75,0%; Co-Negatividade = 97,4%; Teste exato de Fisher $p = 0,0014$

Tabela 8: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina (RIF) pelo MRN e da PCR-MAS (a partir de escarro), para a mutação do gene *rpoB* em 27 amostras de pacientes com TB pulmonar paucibacilar.

PCR-MAS (escarro paucibacilar)	Método de Redução de Nitrato		Total
	Resistente RIF (%)	Sensível RIF (%)	
Mutação do gene <i>rpoB</i>	1 (50,0)	10 (40,0)	11 (40,7)
Ausência de Mutação	1 (50,0)	15 (60,0)	16 (59,3)
Total	2 (100,0)	25 (100,0)	27 (100,0)

RIF – Rifampicina; Índice $\kappa= 0,0326$; Replicabilidade= Fraca; Co-Positividade = 50,0%; Co-Negatividade = 60,0%; Teste exato de Fisher $p= 1,000$

5.3 Análise de concordância entre as PCR-MAS realizadas a partir de amostras de escarro e a partir de *M. tuberculosis* isolados de cultivo, para detecção de genes associados à resistência à Isoniazida e Rifampicina.

Os resultados dos ensaios de PCR-MAS realizados a partir de amostras de escarros e de isolados de cultivos de *M. tuberculosis*, de pacientes de TB multibacilar e paucibacilar (Tabela 9), apresentaram boa concordância (Índice $\kappa= 0,5774$) para detecção das mutações gênicas no *katG* ou *inhA*.

Tabela 9: Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarros e de isolados de cultivos de *M. tuberculosis*, para detecção de mutações de genes *katG* ou *inhA*, de 69 pacientes de TB pulmonar multibacilar e paucibacilar.

PCR-MAS (escarro multi e paucibacilar)	PCR-MAS (cultivo)		Total
	Mutações <i>katG</i> ou <i>inhA</i> (%)	Ausência de Mutação (%)	
Mutações <i>katG</i> ou <i>inhA</i>	6 (85,7)	6 (9,7)	12 (17,4)
Ausência de Mutação	1 (14,3)	56 (90,3)	57 (82,6)
Total	7 (100,0)	62 (100,0)	69(100,0)

Índice $\kappa= 0,5774$; Replicabilidade= Boa; Co-Positividade = 85,7%; Co-Negatividade = 90,3%

A PCR-MAS teve uma concordância excelente (Índice $\kappa = 0,8065$), para detecção de mutações nos genes de *katG* ou *inhA*, quando as amostras de escarro e os isolados de *M. tuberculosis* eram oriundos dos pacientes de TB pulmonar multibacilar

(Tabela 10). Este mesmo desempenho não foi observado para as amostras oriundas de pacientes de TB pulmonar paucibacilar (Tabela 11).

Tabela 10: Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarro e de isolados de cultivos de *M. tuberculosis*, para detecção de mutações de genes *katG* ou *inhA*, de 42 pacientes de TB pulmonar multibacilar.

PCR-MAS (escarro multibacilar)	PCR-MAS (cultivo)		Total
	Mutações <i>katG</i> ou <i>inhA</i> (%)	Ausência de Mutação (%)	
Mutações <i>katG</i> ou <i>inhA</i>	5 (100,0)	2 (5,4)	7 (16,7)
Ausência de Mutação	0 (0,0)	35 (94,6)	35 (83,3)
Total	5 (100,0)	37 (100,0)	42 (100,0)

Índice kappa= 0,8065; Replicabilidade= Excelente; Co-Positividade= 100,0%; Co-Negatividade = 94,6%

Tabela 11: Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarro e de isolados de cultivos de *M. tuberculosis*, para detecção de mutações de genes *katG* ou *inhA*, de 27 pacientes de TB pulmonar paucibacilar.

PCR-MAS (escarro paucibacilar)	PCR-MAS (cultivo)		Total
	Mutações <i>katG</i> ou <i>inhA</i> (%)	Ausência de Mutação (%)	
Mutações <i>katG</i> ou <i>inhA</i>	1 (50,0)	4 (16,0)	5 (18,5)
Ausência de Mutação	1 (50,0)	21 (84,0)	22 (81,5)
Total	2 (100,0)	25 (100,0)	27(100,0)

Índice kappa= 0,2012; Replicabilidade= Fraca; Co-Positividade= 50,0%; Co-Negatividade = 84,0%

Para detecção da mutação do gene *rpoB*, pela PCR-MAS em escarros e em isolados de cultivo de *M. tuberculosis*, houve boa concordância para a PCR-MAS com amostras de pacientes de TB de forma geral (Tabelas 12); uma concordância excelente entre amostras oriundas de pacientes com TB pulmonar multibacilar (Tabela 13) e uma concordância fraca (Tabela 14) nas amostras de pacientes com TB pulmonar paucibacilar.

Tabela 12: Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarros e de isolados de cultivos de *M. tuberculosis*, para detecção de mutação do gene *rpoB*, de 69 pacientes de TB pulmonar multibacilar e paucibacilar.

PCR-MAS (escarro multi e paucibacilar)	PCR-MAS (cultivo)		Total
	Mutação <i>rpoB</i> (%)	Ausência de Mutação (%)	
Mutação <i>rpoB</i>	6 (66,7)	9 (15)	15 (21,7)
Ausência de Mutação	3 (33,3)	51 (85,0)	54 (78,3)
Total	9 (100,0)	60 (100,0)	69 (100,0)

Índice kappa= 0,4026; Replicabilidade= Boa; Co-Positividade = 66,7%; Co-Negatividade = 85,0%

Tabela 13: Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarros e de isolados de cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*, para detecção de mutação do gene *rpoB*, de 42 pacientes de TB pulmonar multibacilar.

PCR-MAS (escarro multibacilar)	PCR-MAS (cultivo)		Total
	Mutação <i>rpoB</i> (%)	Ausência de Mutação (%)	
Mutação <i>rpoB</i>	4 (66,7)	0 (0,0)	4 (21,7)
Ausência de Mutação	2 (33,3)	36(100,0)	38 (78,3)
Total	6 (100,0)	36 (100,0)	42(100,0)

Índice kappa= 0,7742; Replicabilidade= Excelente; Co-Positividade = 66,7%; Co-Negatividade = 100,0%

Tabela 14: Distribuição dos resultados obtidos da PCR-MAS em amostras de escarros e de isolados de cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*, para detecção de mutação do gene *rpoB*, de 27 pacientes de TB pulmonar paucibacilar.

PCR-MAS (escarro paucibacilar)	PCR-MAS (cultivo)		Total
	Mutação <i>rpoB</i> (%)	Ausência de Mutação (%)	
Mutação <i>rpoB</i>	2 (66,7)	9 (37,5)	10 (40,7)
Ausência de Mutação	1 (33,3)	15(62,5)	17 (59,3)
Total	3 (100,0)	24 (100,0)	27(100,0)

Índice kappa= 0,1346; Replicabilidade= Fraca; Co-Positividade = 66,7%; Co-Negatividade = 62,5%

Os resultados apresentados nas Tabelas 12, 13 e 14 evidenciam desempenhos semelhantes aos observados na análise de concordância para detecção da mutação dos genes *katG* ou *inhA*.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que o percentual global de Tuberculose multirresistente (TBMR), entre os casos novos, está em torno de 3,7% (variação: 2,1 a 5,2%) e entre os casos de retratamento em torno de 20,0% (variação: 13 a 26,0%) (WHO, 2012). O Brasil está entre os países do mundo com percentual na faixa de 0 a 2,9 % de TBMR entre os casos novos de TB (WHO, 2012).

No Brasil, ainda não foram publicados os resultados completos do II Inquérito Nacional de Resistência aos fármacos anti-TB. No entanto, de acordo com a análise de dados preliminares realizada em 7 estados (Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Bahia, Distrito Federal, Santa Catarina, Minas Gerais e São Paulo), as taxas de TBMR primária e adquirida foram, respectivamente, de 1,4% (variação: 1,0-1,8%) e 7,5% (variação 5,7 a 9,9%) (KRITSKI, 2010).

Recentemente no trabalho publicado por Garrido et al. (2012), realizado no estado do Amazonas, os autores relataram 3 casos de pacientes, sem tratamento prévio para TB, com resistência múltipla aos fármacos de primeira linha anti-TB. Segundo dados do Sistema TBMR/MS, no Amazonas foram notificados 27 casos de TBMR em 2011. Dados que refletem a necessidade de realizar diagnóstico precoce da TBMR, instituindo tratamento imediato e assim prevenindo a transmissão de cepas resistentes de *M. tuberculosis*.

No presente estudo, apesar do foco não ter sido um estudo epidemiológico, os resultados obtidos no teste de sensibilidade aos fármacos, mostrou um panorama preocupante em relação aos casos de TBMR. O percentual de resistência combinada aos fármacos de primeira linha, a Isoniazida e a Rifampicina, foi superior a 10,0% (Figura 8).

Assim como, foi elevado o percentual de isolados resistentes, oriundos de amostras de pacientes (TB multibacilar e TB paucibacilar) que nunca haviam sido tratados para TB (32,6%) (Figura 9), significando que a frequência de bacilos resistentes é real e crescente, fato que necessita de medidas de controle mais efetivas.

O desenvolvimento ou aperfeiçoamento de métodos para a determinação rápida de resistência aos fármacos em isolados de *M. tuberculosis* por técnicas moleculares é a alternativa para a melhoria do controle da TBMR.

Neste contexto, a detecção de mutações gênicas, tais como dos genes *katG* e *inhA*, em isolados de *M. tuberculosis*, tem sido fortemente associado com resistência à Isoniazida, em diversos trabalhos realizados (MOKROUSOV et al., 2002b; YANG et al. 2005; PERIZOLLO et al. 2012; CHIA et al. 2012).

Em contraste, no presente estudo, a avaliação da PCR-MAS em amostras de escarros de 18 pacientes de TB (multibacilares e paucibacilares), com isolamento de *M. tuberculosis* fenotipicamente resistentes à Isoniazida, apenas 4 (22,2%) apresentaram a mutação para o gene *katG* (Tabela 3). A possível explicação para este fato, é que os isolados obtidos possam ter mutação (ões) em outras regiões do gene ou em outros genes como *kasA*, *ndh* ou *ahpC* (LAURENZO; MOUSA, 2011), não detectados pelo protocolo da PCR-MAS utilizado, e que certamente devem estar associados à resistência à Isoniazida.

A análise da PCR-MAS separadamente nas amostras de escarro multibacilares ou paucibacilares, também não evidenciou concordância, com fraco índice *kappa*. E o resultado do teste exato de Fisher, para avaliar a associação entre a presença de mutações nos genes *katG* ou *inhA* com a resistência a Isoniazida, não foi significativo (Tabelas 4 e 5), indicando que para as amostras analisadas neste estudo, as mutações *katG* ou *inhA* não podem ser utilizadas como marcador de resistência ao fármaco Isoniazida.

Apesar dos estudos que evidenciam forte associação da mutação na sequência de DNA referente ao códon 315 do gene *katG* e a resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*, há estudos que mostram que esta associação é variável. Por exemplo, o estudo de Cardoso et al. (2004) descreveu que 23,7% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à Isoniazida tinham mutações em sequências referentes a códons diferentes do 315 e 14,4% não apresentaram mutações no *katG*. O trabalho do Chia et al. (2012) não conseguiu detectar a mutação do *katG* por PCR-MAS em 16,4% em *M. tuberculosis* resistentes, e explica que este resultado ocorreu por deleções, mutações silenciosas, mutações em outros genes ou região diferente do próprio *katG* ou por duplicação de grandes regiões gênicas.

Outro trabalho realizado foi o de Gonçalves et al. (2012) que relataram a não detecção de mutantes para o *katG* 315, por PCR em tempo real, em 45% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à Isoniazida. Além disso, discutiram que as discrepâncias na associação entre a mutação no *katG* e a resistência fenotípica nos diversos estudos podem estar relacionados com o uso de diferentes métodos fenotípicos para os testes de sensibilidade e diferenças na época, região geográfica e no número de isolados de *M. tuberculosis* testados. Em Manaus- AM, Ogusku (2012) sequenciou 68 clones de *M. tuberculosis* resistentes à Isoniazida e encontrou uma frequência baixa da mutação na sequência referente ao códon 315 do gene *katG* (4,4%), além de mutações ainda não descritas (11,7%) e não detectou nenhuma para o gene *inhA*. Estes resultados corroboram os resultados obtidos no presente estudo.

Para o fármaco Rifampicina, o desempenho da PCR-MAS apresentou concordância fraca (Índice *kappa* = 0,2931) para a detecção de mutação no gene *rpoB*, pois a presença da mutação foi detectada em amostras que foram sensíveis a Rifampicina (17,5%). No entanto, houve associação significativa ($p=0,0177$) entre a mutação no gene *rpoB* a

resistência à Rifampicina, pois de 6 amostras resistentes pelo Método da Redução do Nitrato, 4 carregavam a mutação no gene *rpoB* (66,7%) (Tabela 6).

A avaliação da PCR-MAS em relação ao MRN para Rifampicina, nas amostras obtidas de pacientes de TB pulmonar multibacilares, indicou boa concordância (Índice $kappa = 0,7237$) (Tabela 7). A co-positividade (sensibilidade) alcançou 75,0%, enquanto a co-negatividade (especificidade) foi de 97,4%, resultados estes foram comparáveis aos observados em outros estudos utilizando isolados de *M. tuberculosis* (YANG et al., 2005; PRAMMANANAN, et al. 2008; CHIA et al., 2012; PERIZOLLO et al., 2012). Estes resultados sugerem que as amostras oriundas desta forma clínica de pacientes poderão ser utilizadas para monitorar a resistência à Rifampicina, pelo PCR-MAS, de forma rápida e segura. O teste exato de Fisher, apresentou associação significativa da presença de mutação do gene *rpoB* com resistência à Rifampicina ($p=0,0014$), ratificando que as mutações nesse gene poderão ser utilizados como marcadores genéticos de resistência.

Nas amostras de escarro de pacientes TB pulmonar paucibacilares, os resultados da PCR-MAS para as mutações do gene *rpoB*, não foram satisfatórios, quando comparados aos resultados fenotípicos (Tabela 8). A detecção da mutação no gene *rpoB* em 10 amostras (40,0%) que foram fenotipicamente sensíveis, pode significar que os indivíduos estejam com uma infecção policlonal, sendo que o predomínio de uma ou outra população de clones (sensíveis e resistentes) possam estar influenciando nos resultados de ambos os testes realizados.

Em relação aos testes de concordância entre o PCR-MAS de escarro e PCR-MAS de isolado de *M. tuberculosis* de cultivo, tanto para pesquisa de mutação dos genes *katG* e *inhA* associados a resistência a Isoniazida e *rpoB* para Rifampicina apresentaram resultados excelentes nas amostras de pacientes de TB pulmonar multibacilar (Tabelas 10 e

13), boa para as amostras multibacilares + paucibacilares (Tabelas 9 e 12) e fraca para as amostras de paucibacilares (Tabelas 11 e 14).

Os resultados de concordância sugerem que para a PCR-MAS as amostras de escarro de pacientes de TB pulmonar multibacilar podem ser utilizadas para triagem de resistência aos fármacos. No entanto, as mutações nos genes *katG* e *inhA* não foram associadas a resistência fenotípica a Isoniazida, o que faz com que a PCR-MAS não seja utilizada para monitorar ou pesquisar a resistência para este fármaco. Adicionalmente, outras regiões do gene *katG* e *inhA* ou mesmo de outros genes devem ser investigadas para se estabelecer marcadores genéticos associados a resistência a Isoniazida, em isolados de *M. tuberculosis* circulantes no Amazonas, que parecem exibir características genéticas de resistência diferentes das observadas em outras regiões do Brasil e de outros países.

Os resultados da PCR-MAS para detecção de mutações para o gene *rpoB*, observadas em amostras de escarro de pacientes de TB pulmonar multibacilar foram excelentes (Tabela 13). Estes resultados foram comparáveis aos observados para o equipamento automatizado Gene Xpert RIF. (BOEHME et al., 2010). Assim, o teste poderá ser empregado para monitorar a resistência a Rifampicina, em casos novos ou em casos previamente tratados, e consequentemente, auxiliar no direcionamento do tratamento dos pacientes de TB.

Finalmente, os resultados obtidos com a PCR-MAS, a partir de amostras de escarros, foram promissores para monitorar e pesquisar a resistência a Rifampicina, e poderá ser empregado na rede básica de saúde, pois é um teste rápido, reprodutível e de baixo custo.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

7.1 A PCR-MAS, a partir de amostras de escarros, apresentou boa concordância com o Método de Redução de Nitrato para as amostras oriundas de pacientes de TB pulmonar multibacilar. Visto que, a mutação do gene *rpoB* detectada na PCR-MAS, foi associada com a resistência a Rifampicina. Este mesmo desempenho não foi observado para as amostras de pacientes de TB pulmonar paucibacilar;

7.2 A PCR-MAS, a partir de amostras de escarros, não apresentou desempenho satisfatório para a detecção das mutações dos genes de *katG* e *inhA* quando comparada aos resultados fenotípicos de resistência a Isoniazida pelo Método de Redução de Nitrato;

7.3 Houve concordância da PCR-MAS a partir de amostras escarros e de isolados de cultivo de *M. tuberculosis*, para detecção de mutações dos genes *katG*, *inhA* e *rpoB*, quando as amostras foram de pacientes de TB pulmonar multibacilar;

7.4 A PCR-MAS executada diretamente do escarro poderá ser utilizada para monitorar a resistência a Rifampicina, em pacientes de TB pulmonar multibacilar, considerando que as mutações no gene *rpoB* estão fortemente associadas com resistência a esse fármaco.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ÄNGEBY, K. A. K.; LISBETH, K.; HOFFNER, S. E. Rapid and Inexpensive Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a Nitrate Reductase Assay. **Journal of Clinical Microbiology**.v.40, n. 2, p. 553–555, 2002.

ALLEGUI , Z.; ASMA GHARIANI, A.; DRAOUI, H.; GHEZAL, A.; MEHIRI, M.; SLIM-SAIDI , L. Detection of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay.**International Journal of Mycobacteriology**.p. 34-39, 2012.

ANEK-VORAPONG, R.; SINTHUWATTANAWIBOOL, C.; PODEWILS, L. J., MCCARTHY, K.; NGAMLERT, K.; PROMSARIN, B.; VARMA, J. K. Validation of the GenoType® MTBDRplus assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. **BioMed Central Infectious Diseases**. v.10, p. 123.

AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. BioEstat 5.0. Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. p. 156-157, 2007. Belém-Pará-Brasil. Disponível em: www.mamiraua.org.br/download. Acesso em 26 de julho de 2011.

BANG, D.; ANDERSEN, A. B.; THOMSEN, V. O. Rapid Genotypic Detection of Rifampin-and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Directly in Clinical Specimens. **Journal of clinical microbiology**. v. 44, n. 7,p. 2605–2608, 2006.

BOEHME, C. C.; NABETA, P.; HILLEMANN, D.; NICOL,P.M.; SHENAI, S.; KRAPP, F.; ALLEN,J.;TECH, B.; TAHIRLI, R.; BLAKEMORE,R.; Roxana Rustomjee, R.; Milovic, A.; JONES, M.; Sean M. O'BRIEN, S. M.; PERSING, D. H.; RUESCHGERDES, S.; GOTUZZO,E.; RODRIGUES, C., ALLAND,D.; PERKINS, M.D. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance.**The new england journal o f medicine**. v. 363, n.11, p. 1005–1015, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. 1 ed. Série A, Brasília. p.123 e 436, 2008.

BRASIL, Secretaria de Estado da Saúde. Divisão de Tuberculose. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Mudanças no tratamento da Tuberculose. Informe Técnico. **Revista de Saúde Pública**. ; v.44, n.1: p.197-9, São Paulo, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilancia Epidemiologica. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Série Histórica da Taxa de Incidência de Tuberculose. Brasil. Regiões e Unidades Federadas de residência por ano de diagnóstico (1990 a 2011).Disponível:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa_incidencia_tuberculosis_e_1990_2011.pdf. Fonte: Sinan/SVS/MS, atualizado em 16/02/2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Brasília, 2012. Fonte: Sinan/SVS/MS, atualizado em 22/02/2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das doenças transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose. NOTA TÉCNICA Nº 03/2013/CGPNCT/DEVIT/SVS/MS. Brasília, 2013.

BRATS, Boletim Brasileiro de Avaliação de tecnologia em Saúde. n. 16, p. 1-14, 2011.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L.GOODMAN& GILMAN.As Bases Farmacológicas da Terapêutica. In: JUNIOR, W.A.P. Quimioterapia da Tuberculose, Complexo Mycobacterium Avium e Hanseníase. 11ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.

CARDOSO, R. F.; COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G. P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C. Q. F.; SATO, D. N.; SHIKAMA, M. L.; MAMIZUKA, E. M.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H. Characterization of ndh gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 102, n.1, p.59-61.

CARVALHO, W.S; MIRANDA, S.S; PESQUEIRO, J.L.; GOMES, M.A. Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.43, n.1, 2007.

CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J.; HAUDUROY, P.; LANGEROVA,M.; MAHLER,H.T; MEISSNER, G.; MITCHISON, D.A; SULA, L. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance. **Bulletin of the World Health Organization**. v.29, p.565-578, 1963.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection. v.49, n. RR-6, MMWR 2000.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. Plan to Combat Extensively Drug-Resistant Tuberculosis Recommendations of the Federal Tuberculosis Task Force. v. 58, n. RR-3, MMWR 2009.

CHAN, E. D.; ISEMAN, M. D. Current medical treatment for tuberculosis.**British Medical Journal**. v. 325, n. 7375, p.1282-6, 2002.

CHIA, B. S; LANZAS, F.; RIFAT, D.; HERRERA, A.; KIM, E. Y.; SAILER, C.; CHAVOLLA, E. T.; NARAYANASWAMY, P.; EINARSSON, V.; BRAVO, J.; PASCALE, J. M.; IOERGER, T. R.; SACCHETTINI, J. C.; KARAKOUSIS, P. C. Use of Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) to Detect Multidrug-Resistant Tuberculosis in Panama. **PLoS ONE** v. 7, n.7, p.1-7, 2012.

CRICK, D.C.; MAHAPATRA; S.; BRENNAN, P.J. Biosyntheses of the arabinogalactano-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. **Glycobiology**. v. 11 n.9, p.107-118, 2001.

DALCOLMO, M.P.; ANDRADE, M.K.N.; PICON, P.D. Tuberculose Multirresistente no Brasil: Histórico e medidas de controle. **Revista Saúde Pública**. v. 41 n.1, p. 34-42, 2007.
DE SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 678-682, 2005.

ESPINAL, M.A. The global situation of MDR-TB. **Tuberculosis**. v. 83, p. 44-51, 2003.

EVANS, J.; STEAD, M.C.; NICOL, M.P.; SEGAL, H. Rapid genotypic assays to identify drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 63, p.11–16, 2008.

FERREIRA, A. A. A.; QUEIROZ, K. C. S.; TORRES, K. P.; FERREIRA, M. A. F.; ACCIOLY, H.; ALVES, M. S. C. F. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. **Revista Brasileira de Pneumologia**. v. 8, n.2, p.142-149, 2005.

FREITAS, F. A. D.; SIQUEIRA, H. R.; ALBANO, R.M. Métodos Moleculares no diagnóstico da tuberculose e na resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas. **Pulmão**. v.18, n.2, p. 96-101, 2009.

GARRIDO, M. S.; TALHARI, A. C.; ANTUNES, I. A.; JOYCENEA DA SILVA MATSUDA, J. S.; ZARANZA, E. G.; FLOR ERNESTINA MARTINEZ-ESPINOSA, F. E. M.; SÉKULA, S. B. Primary multidrug-resistant tuberculosis and its control implications in the State of Amazonas, Brazil: report of 3 cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.45, n.4, p. 530-532, 2012.

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

GONÇALVES, M. G.; FUKASAWA, L. O.; ROSANGELA SIQUEIRA OLIVEIRA, R. S.; SALGADO, M. M.; HARRISON, L. H.; KATHLEEN A SHUTT, K. A.; SACCHI, C.T. Fast test for assessing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by real-time PCR. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.107, n.7, 2012.

HERMANS, P.W.M.; VAN SOOLINGEN D.; DALE J.W.; SCHUITEMA A.R.; MCADAM, R.A.; CATTY, D.; VAN EMBDEN J.D.; Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. **Journal of clinical microbiology**. v. 28, n. 9, p. 2051-2058, 1990.

HERRERA-LEÓN, L.; MOLINA, T.; SAÍZ, P.; SAÍZ-NIETO, J. A.; JIMÉNEZ, M. S. New Multiplex PCR for Rapid Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 49, n.1, p. 144–147, 2005.

HILLEMANN, D.; RU" SH-GERDES, S.; RICHTER, E.; Evaluation of the genotype MTBDR plus assay for rifampicin and isoniazida susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples .**Journal of clinical microbiology**. v. 45, n. 8, p. 635–2640, 2007.

HUYEN, M. N. T.; TIEMERSMA, E. W.; LAN, N. T. N.; COBELENS, F. G. J.; DUNG, N. H.; SY, D. N.; BUU, T. N.; KREMER, K.; HANG, P. T.; CAWS, M.; O'BRIEN, R.; VAN SOOLINGEN, D. Validation of the GenoType MTBDRplus assay for diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in South Vietnam.**BioMed Central Infectious Diseases**, v.10, p.149, 2010.

KRITSKI, A. L. Emergência de tuberculose resistente: renovado desafio. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. v.36, n.2, p. 157-158, 2010.

LAURENZO, D.; MOUSA, S. A. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. **Acta Tropica**, v.119, p. 5-10, 2011.

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

LEÃO, S. C.; MARTIN, A.; MEJIA, G. I.; PALOMINO, J. C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M. A. S.; PORTAELS, F. Pratical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. European Commission International Co-operation (INCO) for Developing countries (DEV) concerted Action (CA). Project No. ICA4-CT-2001-10087, **Brussels, Belgium**. p. 113-116, 2004.

LUNA, J. A. C. Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. **Archivos de Bronconeumologia**, v. 37, n.1, p.35-42, 2001.

MARTINS, E. S. J. Avaliação de modificações no método de redução de nitrato visando a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

MELLO, F.C.Q . Abordagem Diagnóstica da Tuberculose Pulmonar. **Pulmão**. v. 21, n.1, p. 27-31, 2012.

MOKROUSOV, I.; NARVSKAYA, O; LIMESCHENKO, E; OTTEN, T.; VYSHNEVSKIY, B. Detection of Ethambutol-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by a Multiplex Allele-Specific PCR Assay Targeting emB306 Mutations. **Journal of clinical microbiology**. v. 40, n. 5, p. 1617–1720, 2002a.

MOKROUSOV, I.; OTTEN, T.; FILIPENKO, M.; VYAZOVAYA, A.; CHRAPOV, E.; LIMESCHENKO, E.; STEKLOVA, L.; VYSHNEVSKIY, B.; NARVSKAYA, O. Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by a Multiplex Allele-Specific PCR Assay Targeting *katG* Codon 315 Variation. **Journal of clinical microbiology**. v. 40, n. 7, p. 2509–2512, 2002 b.

MOKROUSOV, I.; OTTEN, T.; VYSHNEVSKIY, B.; NARVSKAYA, O. Allele-specific *rpoB* PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Smears. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.47, n.7, p. 2231–2235, 2003.

MUSA, H.R.; AMBROGGI, M.; SOUTO, A.; ÄNGEBY, K.A.K. Drug Susceptibility Testing Of *Mycobacterium Tuberculosis* By A Nitrate Reductase Assay Applied Directly On Microscopy-Positive Sputum Samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43 n.7, p. 3159–3161, 2005.

OGUSKUI, M. M.; SADAHIRO, A; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; ZAITZ, C.; SALEM, J. I.PCR in the diagnosis of cutaneous tuberculosis.**Brazilian Journal Microbiology**. v. 34, n. 2, 2003.

OGUSKU, M. M.; OKAMURA, L.H.; MARTINS, E.S.J.; SADAHIRO, A.; SALEM, J.I. PCR-Multiplex Alelo Específico (PCR-MAS) para a determinação rápida da sensibilidade aos antibióticos isoniazida e rifampicina em *Mycobacterium tuberculosis* isolados no Amazonas. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas - PE. Microbiologia in Foco. São Paulo - SP: **Sociedade Brasileira de Microbiologia**. v. único. p. 93-93, 2009.

OGUSKU, M. M. Investigação de Tuberculose Pulmonar por infecção Policlonal de *Mycobacterium tuberculosis* e possível associação com a resistência aos fármacos antimicrobianos. 109 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

OPLUSTIL, C. P.; TEIXEIRA, S. R.; OSUGUI, S. K.; MENDES, C. F.Impact of automation in the diagnosis of mycobacterial infection. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**.v. 38, n. 3, p. 167-173, 2002.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; GROLL, A. V.; PORTAELS, F. Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**. 2008.

PARK, S. H.; BENDELAC, A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection.**Nature**.v.406, p.788-792, 2000.

PRAMMANANAN,T.;CHEUNOY,W.;TAECHAMAHAPUN,D.;YORSANGSUKKAMO L J.; PHUNPRUCH, S.; PHDARAT, P.; LEECHAWENGWONG, M.; CHAIPRASERT, A. Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) strains from Thailand and development of a rapid method for mutation detection. **Clinical Microbiology and Infection**. v.14, n.5, p. 446-53, 2008.

PERSUBN, D. C. Biologia Molecular: Inovações e Perspectivas na Avaliação Laboratorial de Doenças Infecciosas. In: - Bresolin, T.M.B.; Cechinel-Filho, V. Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem Multidisciplinar, Ed. Santos, São Paulo, 2010.

PIERRE, C.; LECOSSIER, D.; BOUSSOUGANT,Y; BOCART, D.; JOLY, V.; YENI, P.; HANCE, A. J. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA.**Journal of Clinical Microbiology**. v. 29, n. 4, p.712-717, 1991.

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

QUIROS-ROLDAN, E.; AIROLDI, M.; MORETTI, F.; CAROSI, G.. Bases moleculares de Resistência de *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista de Diagnostico Biológico**. v.50, n.4 p. 200-203, 2001.

RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. **Emerging Infectious Diseases**. v.4, n.2, p.195-208,1998.

RIEDER, H.L. Interventions for tuberculosis control and elimination. Paris: **International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD)**, p. 26, 2002.

ROOK, G. A. W; DHEDA, K; ZUMLA, A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. **Nature Publishing Group**.v. 5, p.661-667, 2005.

ROSSAU, R.; TRAORE, H., DE BEENHOUWER, H.; MIJS, W; G. JANNES,G.; P. DE RIJK, P. Evaluation of the INNO-LiPA rifampicin tuberculosis assay: a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampicin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 10, p. 2093-2098, 1997.

ROSSETTI, M.L.R.; VALIM, A.R.M.; SILVA, M.S.N.; RODRIGUES, V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**. v. 36, p. 525-32, 2002.

SAKULA, A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus. **Thorax**. v. 37, p. 246-251,1982.

SALEM, J.I.; GOH, K.S.; LITAIFF, L.R.; CARDOSO, M.S.L.; BRIGLIA, M.F.S. An investigation of *Mycobacterium tuberculosis* in Manaus/Amazonas, Brazil. **Jornal de Pneumologia**.v.16, n.1, p. 6-8, 1990.

SALEM, J. I.; CARVALHO, C. M.; OGUSKU, M.M. PKO – Alternativemethod for isolating *Mycobacterium* froms putum. **Acta Amazônica**.v.37, n.3, p. 419-424, 2007.

SANCHONETE, K.O.; GROLL, A. V.; RAMOS, D. SCHOLANTE, A.B.; HONSCHA, G.; VALENÇA, M.; SCAINI, C.J.; SILVA, P.E.A. Comparative Evaluation Of The Nitrate Reductase Assay And The Resazurin Microtitre Assay For Drug Susceptibility Testing Of *MycobacteriumTuberculosis* Against First Line Anti-Tuberculosis Drugs. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, p.16-20, 2008.

SISTEMA TBMR – MS. Ministério da Saúde. Programa Estadual de Controle da Tuberculose, 2013.

SLAYDEN, R.A.; LEE, R.E.; BARRY, C.E. Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacteriumtuberculosis*. **Molecular Microbiology**. v.38, n.3, p.514-25, 2000.

SATO, D.N. Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene da luciferase. 76p. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara – SP, 2003.

SEMSA, Secretaria Municipal de Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica e Ambiental. Análise das Ações para o Controle da Tuberculose em Manaus. Janeiro, 2012.

SBPT, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso brasileiro de tuberculose: Diretrizes brasileiras para tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**.v.30,supl.1,c.3, p.S24-S37, 2004.

SBPT, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.35, n.10, p.1018-1048, 2009.

SOINI, H; MUSSER, J.M. Molecular diagnosis of mycobacteria. **Clinical Chemistry**. v. 47, n. 5, p. 809-14, 2001.

SCHLOSSBERG, D. Tuberculosis & Nontuberculous Mycobacterial Infections. 5ª edição. United States of America: Mc-Graw-Hill, 2005.

TORTOLI, E; CICHERO, P.; PIERSIMONI, C.; SIMONETTI, M.T.; GESU, G.; NISTA, D. Use of BACTEC MGIT 960 for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens: Multicenter Study.**Journal of Clinical Microbiology**.v. 37, n. 11, p. 3578–3582, 1999.

VADWAI, V.; SHETTY, V.; RODRIGUES, C. Multiplex allele specific PCR for rapid detection of extensively drug resistant tuberculosis. **Tuberculosis**. v. 92, p. 236-242, 2012.

VAN EMBDEN, J. D. A.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J. T.; DALE, J.W.; EISENACH, K. D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; McADAM, R.; SHINNICK, T. M.; SMALL, P. M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**., v. 31, p. 406-409, 1993.

VAN RIE, A.; PAGE-SHIPPI, L.; SCOTT, L.; SANNE, I.; STEVENS, W. Xpert(®) MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope?. **Expert Reviews Molecular Diagnostic**. v.7, n.10, p.937-46, 2010.

VIEDMA, D.G., INFANTES, M.S.D., LASALA, F., CHAVES, F., ALCALÁ, L. E BOUZA, E. New Real time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance and high level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**.v. 40, n.3, p.988-995, 2002.

VIEDMA, G. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. **Clinical Microbiology and Infection**.v. 9, p.349-359, 2003.

WAYNE, L.; G.E KUBICA, G.P. Genus *Mycobacterium*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N,S.; SHARPE; M.E.; HOLT J. G. (Ed.) Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, v. 2,p. 1436-1457. **Baltimore Williams & Wilkins**,1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.Global tuberculosis report 2012.

WORD HEALTH ORGANIZATION. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. **Policy statement**, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: a short update the report, Geneva, 2009.

WORD HEALTH ORGANIZATION.Anti-tuberculosis drug resistance in the world.Fourth global report.The WHO/ IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveilliance, 2002-2007.Geneva, 2008.

YANG, Z.; DURMAZ, R.; YANG, D.; GUNAL, S.; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; SANIC, A.; MARRS, C.F. Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, p. 201-208, 2005.

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

9. APÊNDICES

9. APÊNDICES

APÊNDICE 1- Registro e Ficha de Coleta de dados

Registro e Ficha de coleta de dados

Projeto: Avaliação do desempenho de uma ferramenta molecular para detecção de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência a rifampicina e isoniazida, a partir de amostra clínica.

Nº. Registro Laboratório do INPA _____		Data: ____/____/____
Nome do Paciente: _____		
Nº. Prontuário "Cardoso Fontes" : _____		
Endereço: _____		
_____ Telefone: _____		
Local de nascimento: Município: _____		UF: _____
Procedência (Município): _____		UF: ____ Há quanto tempo _____
Data de Nascimento	Sexo: M () F ()	Ocupação: _____
Informações clínicas:		
Antecedente pessoal de TB	Não () Sim ()	Qual época: _____
Antecedente familiar de TB	Não () Sim ()	Qual época: _____
BCG: Não () Sim ()	PPD: Não () Sim ()	_____ mm
	RX Torax: Não () Sim () → Normal () Alterado ()	
Quais os sintomas?	() Tosse; () Febre; () Dor torácia; () Expectoração; () Hemoptise	
	() Emagrecimento; () Dispnéia; () Cansaço; () Dor de cabeça	
	() Outros sintomas, quais? _____	

	Há quanto tempo vem sentindo os sintomas _____	
Tratamento:		
Esquema de tratamento:	Esquema I () Esquema Especial () Qual? _____	
Completo o tratamento	Não () Sim () Tempo de tratamento _____	
Período do tratamento:	_____	
Informação adicional:	_____	

Doenças Associadas	Não () Sim () Qual (is)? _____	
Faz uso de medicamento	Não () Sim () Qual (is)? _____	
Tabagista	Não () Sim () Quanto tempo? _____	
Exames Laboratoriais		
	Resultado da Baciloscopia (em cruces): 1ª. () 2ª. () 3ª. ()	
	Resultado da Baciloscopia concentrada (em cruces): 1ª. ()	
	Resultado do Cultivo: Negativo () Positivo () Identificação _____	

APÊNDICE 2 - Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA)
Laboratório de Micobacteriologia**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar e fazer parte do estudo assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: *Avaliação da PCR multiplex alelo específico para detecção de genes de Mycobacterium tuberculosis associados à resistência a rifampicina e isoniazida, a partir de amostra clínica*

Pesquisador Responsável : Márcia Alves de Souza

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): 3611-2238/ 9252-0951

Pesquisadores participantes: Aya Sadahiro, Júlia Ignez do Nascimento Salem José, Mauricio Morishi Ogusku e Irineide Assumpção Antunes.

Telefones para contato : 9503-0951

Você está com suspeita da doença denominada Tuberculose e está sendo convidado(a) a participar do estudo sob título: "Avaliação do desempenho de uma ferramenta molecular para detecção de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência a rifampicina e isoniazida, a partir de amostra clínica". Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é verificar se o exame chamado de PCR Multiplex (multiplex alle-specific PCR), pode ser utilizado para determinar se a bactéria, caso seja encontrada no seu escarro, apresenta resistência a medicamentos (a rifampicina e a isoniazida) importantes no tratamento da Tuberculose. E caso você participe, será necessário coletar pelo menos duas amostras de escarro. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga qualquer desconforto ou risco à sua vida. Além disso, o resultado deste exame, juntamente com o resultado do exame padrão, serão encaminhados a Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes, para que sejam incluídos no seu prontuário de acompanhamento, para avaliação médica. Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. A sua participação no estudo, não resultará em recebimento de qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

Eu, _____, RG _____ entendi e dou meu consentimento para realizarem os exames do projeto. Atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

.....

...../...../.....

Assinatura do paciente

Data



Impressão do polegar,
caso o paciente não
saiba escrever seu nome

Data:/...../.....

Nome legível do profissional que conversou com o paciente

APÊNDICE 3 - EQUIPE

EQUIPE

Ordem	Participantes	Formação	Titulação	Instituição	Função
01	Márcia Alves de Souza	Farmacêutica e docente	Especialização, mestranda do PPGCF ¹	UFAM ² e UNINORTE ³	Coordenar e executar os procedimentos experimentais
02	Aya Sadahiro	Farmacêutica e docente	Doutorado	UFAM ²	Orientar as atividades da mestranda
03	Mauricio Morishi Ogusku	Farmacêutico	Doutorado	INPA ⁴	Assessorar nos experimentos microbiológicos, testes de sensibilidade e ensaios de biologia molecular
04	Irineide Assumpção Antunes	Médica	Mestre em Ciências da Saúde	SUSAM ⁵	Assessorar na seleção de pacientes
05	Júlia Ignez do N. Salem	Médica	Doutorado	INPA ⁴	Assessorar nas análises dos dados

1 PPGCF- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; 2 UFAM – Universidade Federal do Amazonas; 3 UNINORTE- Centro Universitário do Norte; 4 Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia; 5 SUSAM – Secretaria de Saúde do Estado do Amazonas, Policlínica em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes.

APÊNDICE 4 - ORÇAMENTO

ORÇAMENTO

Material de Consumo

Item	Descrição do Material	Quantidade	Valor unit. R\$	Valor total R\$
01	Isoniazida, frasco com 50 gramas	1	56,00	56,00
02	Rifampicina, frasco com 5gramas	2	1.267,00	2.534,00
03	Oligonucleotídeos liofilizados	10	133,00	1.330,00
04	Agarose grau biologia molecular, frasco com 500 gramas	1	1.450,00	1.450,00
05	EDTA frasco com 100 gramas	2	110,00	220,00
06	Tris frasco com 500 gramas	1	170,00	170,00
07	Ácido bórico 500 gramas	1	59,00	59,00
08	Taq DNA polimerase, frasco com 500 unidades	5	260,00	1.300,00
09	dNTP mix 100mM	2	886,00	1.772,00
10	Etanol Absoluto P.A. frasco com 1L	2	120,00	240,00
11	Clorofórmio P.A. frasco com 1L	2	166,00	332,00
12	Proteinase K 100mg	3	460,00	1.380,00
13	Sybr Green, DNA gel stain	3	260,00	780,00
14	Tubos de centrífuga 15 mL, descartável, esterilizado, pacote com 50 unidades	10	63,00	630,00
15	Tubos de centrífuga 50 mL, descartável, esterilizado, pacote com 25 unidades	5	45,00	225,00
16	Microtubos 1,5 mL, pacote com 500 und	3	40,00	120,00
17	Microtubos 0,5 mL, pacote com 500 und	2	51,00	102,00
18	Microtubos 2,0 mL, pacote com 500 und	2	45,00	90,00
19	Microtubos 0,2 mL, pacote com 500 und	5	145,00	725,00
20	Microtubos 2,0 mL, pacote com 500 und, com tampa rosq.	3	102,00	204,00
21	Ponteiras com filtro capac. de 1000 uL pcte com 1000	10	235,00	2.350,00
22	Ponteiras com filtro capac. de 200 uL pcte com 1000	10	235,00	2.350,00
23	Ponteiras com filtro capac. de 20 uL pcte com 1000	10	235,00	2.350,00
24	Ponteiras com filtro capac. de 10 uL pcte com 1000	10	235,00	2.350,00
26	Luva de procedimento tamanho P caixa com 100	10	23,00	230,00
27	Máscara de proteção, pacote com 50 unidades	2	40,00	80,00
28	Óculos de proteção	1	28,00	28,00
29	Pipetas ajustáveis capac. de 1000 mL	2	860,00	1.720,00
30	Pipetas ajustáveis capac. de 200 mL	2	890,00	1.780,00
31	Pipetas ajustáveis capac. de 10 mL	2	890,00	1.780,00
			TOTAL	28.737,00

Material Permanente

Item	Equipamento	Quantidade	Valor em R\$
01	Termociclador	1	23.000,00

10. ANEXO