

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR



PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE NO
ESTADO DA BAHIA, BRASIL.

JAIRO DA SILVA MUNIZ SOBRINHO

ILHÉUS - BAHIA

2013

JAIRO DA SILVA MUNIZ SOBRINHO

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE NO
ESTADO DA BAHIA, BRASIL.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética de Microrganismos

Orientador: Dr. Fabrício Rios Santos

Co-orientador: Dra. Karla Valéria Batista Lima

ILHÉUS - BAHIA

2013

JAIRO DA SILVA MUNIZ SOBRINHO

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE NO
ESTADO DA BAHIA, BRASIL.**

Ilhéus-BA, 27 de Agosto de 2013.

Dr. Fabrício Rios Santos
UFMT
(Orientador)

Dr. Carla Cristina Romano
UESC

Dr. Paulo Roberto Santana de Melo
UESC

Dr. Rachel Rezende
UESC

Dr. Valdir Queiroz Balbino
UFPE

DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus guias espirituais, à minha mãe (*in memoriam*), ao meu pai, à minha querida irmã, à minha princesa Maite, ao meu amigo Pedro e a todas as pessoas que participaram de minha evolução pessoal e profissional, e que me deram a oportunidade de exercer a caridade e a humildade, dedico.

PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE NO ESTADO DA BAHIA, BRASIL.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo padronizar e validar um método de diagnóstico molecular da resistência aos fármacos do tratamento da tuberculose. A aplicação do método foi possível através da identificação da frequência mutacional dos genes *katG*, *rpoB* e *inhA* em 94 isolados clínicos de *M. tuberculosis*, selecionados na micobacterioteca do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz, do Estado da Bahia (LACEN-BA), no ano de 2007. Posterior ao cultivo do microrganismo em meio Löwenstein-Jensen, e à extração do seu DNA genômico, aplicou-se a técnica de PCR-RFLP, utilizando-se primers e enzimas de restrição para identificação da presença ou não de mutação nos códons 315 do gene *katG*, 531 do *rpoB* e da região promotora do *inhA*. Os dados mostraram que 46,2% das micobacterias resistentes à isoniazida tinham mutação para *katG*, 52,1% para *rpoB* e 22,2% para o *inhA*. Dos isolados sensíveis a este mesmo fármaco, observou-se ausência de mutação para os três genes avaliados. Adicionalmente, foi estudada a relação entre os genes mutantes e a produção de cepas resistentes aos outros quimioterápicos utilizados no tratamento da tuberculose. O método de PCR-RFLP, após padronização, foi validado através do sequenciamento do DNA dos genes supracitados, e pela aplicação do mesmo em amostras de escarro e esfregaço em lâmina de microscopia. Os resultados encontrados permitiram desenvolver um novo protocolo de diagnóstico molecular significativamente sensível (95,2%) e específico (100%), considerando que os genes *katG*, *rpoB* e *inhA* são marcadores adequados para identificação em conjunto de cepas resistentes aos principais fármacos do tratamento da tuberculose: isoniazida e rifampicina.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Resistência; *KatG*; *rpoB*; *inhA*.

**STANDARDIZATION AND VALIDATION OF MOLECULAR DIAGNOSTIC
RESISTANCE TO DRUG TREATMENT OF TUBERCULOSIS IN THE STATE OF
BAHIA, BRAZIL.**

ABSTRACT

This study aimed to standardize and validate a method for molecular diagnosis of drug resistance of tuberculosis treatment. The application of the method was possible by identifying the mutational frequency of genes *katG*, *rpoB* and *inhA* in 94 clinical isolates of *M. tuberculosis*, selected in micobacterioteca Central Laboratory of Public Health, Professor Gonçalo Moniz, the State of Bahia (BA - LACEN), in 2007. Subsequent cultivation of the microorganism in Löwenstein - Jensen, and their genomic DNA extraction was applied to PCR- RFLP, using primers and restriction enzymes to identify the presence or absence of mutation in codons 315 gene *katG*, *rpoB* and 531 of the promoter region of *inhA*. The data showed that 46.2 % of mycobacteria resistant to isoniazid were *katG* mutation, *rpoB* to 52.1% and 22.2 % for the *inhA*. Sensitive isolates of the same drug, we observed absence of mutation for all three genes evaluated. Additionally, we studied the relationship between the genes and production of mutant strains resistant to other chemotherapeutic drugs used in the treatment of tuberculosis. DNA sequencing of the genes mentioned above, and the application of it in sputum samples and smear on a microscope slide validated the PCR - RFLP method, after standardization. Results allowed to develop a new molecular diagnostic protocol significantly sensitive (95.2 %) and specific (100 %), whereas the genes *katG*, *rpoB* and *inhA* are suitable markers to identify together the strains resistant to the main drug treatment tuberculosis: isoniazid and rifampin.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Resistance; *KatG*; *rpoB*; *inhA*.

SUMÁRIO

	Resumo.....	v
	Abstract.....	vi
1	Introdução.....	10
2	Objetivos.....	12
3	Tuberculose: aspectos gerais.....	13
4	Materiais e Métodos.....	29
5	Resultados e Discussão.....	35
6	Conclusão.....	47
7	Referências.....	48

TABELAS E GRÁFICOS

Gráfico 1	14
Gráfico 2	43
Tabela 1	17
Tabela 2	17
Tabela 3	21
Tabela 4	29
Tabela 5	29
Tabela 6	30
Tabela 7	31
Tabela 8	31
Tabela 9	32
Tabela 10	33
Tabela 11	34
Tabela 12	41

FIGURAS

Figura 1	18
Figura 2	19
Figura 3	25
Figura 4	35
Figura 5	36
Figura 6	37
Figura 7	38
Figura 9	44

1 - Introdução

A tuberculose (TB) é um problema de saúde mundial que afeta 8,8 milhões de pessoas por ano no mundo, e matou 1,5 milhões somente em 2011, de acordo a Organização Mundial de Saúde (OMS). O Brasil, por sua vez, esta na décima nona posição no ranking dos 22 países com mais número de casos, tendo uma média de 71 mil novos casos ao ano, com incidência de 51 casos a cada 100.000 habitantes, sendo que, desses, 6,8% apresentaram resistência a pelo menos um dos medicamentos utilizados no tratamento.

A resistência aos fármacos de primeira-linha de tratamento, como a Isoniazida (INH), Rifampicina (RFP), Pirazinamida (PZA) e Etambutol (EMB), agrava a evolução dos sintomas da doença, principalmente nos casos de TB multidrogaresistência (MDR-TB). Atualmente, a OMS define como MDR-TB todos os *M. tuberculosis* que apresentar resistência a pelo menos RFP e INH, o que já atinge valores de aproximadamente 4,8% da população mundial infectada.

A causa dessa resistência está relacionada a diversos fatores, e, dentre eles, pode-se citar a acetilação do fármaco no corpo do paciente, a produção de bombas de efluxo e a impermeabilidade da parede celular muito comumente encontrada nos microrganismos, bem como as mutações observadas em seu DNA. Dentre as mutações, destacam-se aquelas ocorridas nos genes *katG* (que codifica a enzima Catalase-Peroxidase), *inhA* (que codifica a proteína carreadora da enoyl-acyl redutase) e no *rpoB* (β subunidade do RNA polimerase). As proteínas codificadas através desses genes mutantes inativam ou diminuem a ação dos medicamentos ao tratamento, e o acumulo de mutações nesses genes pode produzir cepas MDR-TB.

Nesse sentido, o controle da resistência as drogas na TB requer métodos de diagnostico precisos e rápidos, entretanto, o padrão ouro utilizado atualmente é o isolamento do *M. tuberculosis* em meio *Lowenstein-Jensen*, o qual possui crescimento lento, tendo a liberação dos resultados em um período de tempo que varia entre 90 a 120 dias. No decorrer desse tempo, o paciente ainda continuará liberando formas microbianas no ambiente, caso ainda não tenha começado o tratamento. Caso o tenha, esse tratamento se tornará ineficiente quando o microrganismo apresentar resistência a alguns fármacos, acarretando em malefícios para o próprio indivíduo, como problemas hepáticos e neurológicos.

Dessa forma, o uso de métodos moleculares rápidos, é útil para diagnosticar corretamente o *M. tuberculosis*, bem como também para identificar mutações em genes de resistência, diminuindo gastos com terapias ineficientes, lesões nefrotóxicas e hepatotóxicas

causadas pelos antibióticos utilizados. Embora existam métodos moleculares eficazes e amplamente descritos, ainda é necessário que sejam desenvolvidos métodos adicionais alternativos àqueles já existentes, visando um menor custo para que seja usado em larga escala em saúde pública, principalmente em países menos favorecidos e que não exijam necessariamente o isolamento/cultivo do *M. tuberculosis*.

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho objetivou desenvolver um modelo de triagem diagnóstica utilizando ferramentas moleculares para detecção do *M. tuberculosis* e para a identificação de resistência a INH e RFP, analisados diretamente do escarro e de isolados clínicos.

2 - Objetivos

2.1 Objetivo geral

Descrever a frequência de mutações nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes/sensíveis a INH, a fim de padronizar e validar um diagnóstico molecular de resistência aos fármacos isoniazida e rifampicina utilizados no tratamento da tuberculose, no estado da Bahia.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a frequência de mutação para os genes *katG*, *inhA* e *rpoB* em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*;
- Correlacionar a influência dessas mutações com a ocorrência de resistência e/ou multirresistência aos fármacos utilizados no tratamento da TB;
- Desenvolver fluxo útil na identificação da resistência aos fármacos, através dos resultados de genotipagem;
- Avaliar a sensibilidade e a especificidade da metodologia desenvolvida para o uso diretamente de amostra clínica.

3 – Tuberculose: Aspectos gerais

3.1 A doença e sua epidemiologia

A tuberculose (TB) é uma doença infecto contagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MT), transmitida de pessoa a pessoa principalmente através da via respiratória. Atualmente, a TB caracteriza-se como uma das maiores causas de morte por doença infecciosa tratável no mundo. Portanto, estima-se que cerca de 9,4 milhões de novos casos e 1,7 milhões de mortes por TB ocorrem a cada ano (NICOLETTI, 2010).

A transmissão do *M. tuberculosis* pulmonar se realiza através da contaminação entre comunicantes pelos aerossóis liberados na tosse ou no espirro do paciente bacilífero, também chamados de perdigotos que contém significativa quantidade do microrganismo. Tais partículas possuem tamanho entre 1 e 5 μm , e podem permanecer em suspensão no ar por um longo período de tempo, facilitando a disseminação da doença em ambientes fechados (TIRUVILUAMALA e REICHMAN, 2002).

Ao ocorrer a contaminação por essas partículas por inalação, os bacilos se depositam nos alvéolos pulmonares, interagindo e sendo fagocitados pelos macrófagos alveolares. Apesar de ainda não se conhecer nenhuma endotoxina ou exotoxina produzida por esse microrganismo, o mecanismo de digestão do *Mycobacterium* não ocorrerá dentro daquela célula. O estabelecimento da TB em pessoas com a resposta imune intacta é caracterizado pela formação do granuloma, ocorrendo à ativação dos linfócitos e formação de agregados de macrófagos, limitando a multiplicação do *M. tuberculosis* naquele local (BRASIL, 2008).

A TB pulmonar pode se apresentar em diferentes formas, sendo a primária e a secundária as mais comuns. A primária resulta da infecção inicial do bacilo, sendo a inalação o principal mecanismo utilizado para a invasão; já a secundária, por sua vez, se caracteriza pelo estabelecimento do microrganismo no corpo do paciente, caracterizando a fase crônica da doença (TIRUVILUAMALA e REICHMAN, 2002).

Outra forma clinicamente observada é a tuberculose ectópica. Nesse tipo de lesão, observar-se-á o acometimento de outros órgãos do corpo, como ossos, fígado, rins, linfonodos, dentre outros (BRENNAN, 1995).

O Brasil, segundo a OMS, ocupa o 17º lugar no ranking dos 22 países responsáveis por 80% dos casos de TB no mundo, estimando-se uma prevalência de 5,8 milhões de casos notificados. Segundo o Ministério da Saúde (MS), são diagnosticados 70 mil casos novos e 4,6 mil óbitos anuais devidos à TB no Brasil. Este total de casos constitui a 9ª causa de

internações por doenças infecciosas, o 7º lugar em gastos com internação do Sistema Único de Saúde (SUS) por doenças infecciosas e a 4ª causa de mortalidade por doenças infecciosas (BRASIL, 2013).

A situação mundial da tuberculose está ligada ao aumento da pobreza, à má distribuição de renda e à urbanização acelerada. Este quadro contribui para a manutenção da inferioridade econômica dessas pessoas, pois, como a AIDS, a tuberculose atinge, principalmente, indivíduos que poderiam ser economicamente ativos. A epidemia de AIDS e o controle insuficiente da tuberculose apontam para a necessidade de medidas eficazes de saúde pública. A emergência de focos de tuberculose multirresistente (MDR-TB), tem mobilizado o mundo para uma atenção especial a essa doença (BRAGA *et al.*, 2003).

O Gráfico 1 mostra que no ano de 2012 a incidência de TB foi de 36,1/100.000 hab., apresentando assim sinais de ligeiro decréscimo em relação ao ano de 2011, o qual apresentou a incidência de 38,3/100.000 hab (BRASIL, 2013).

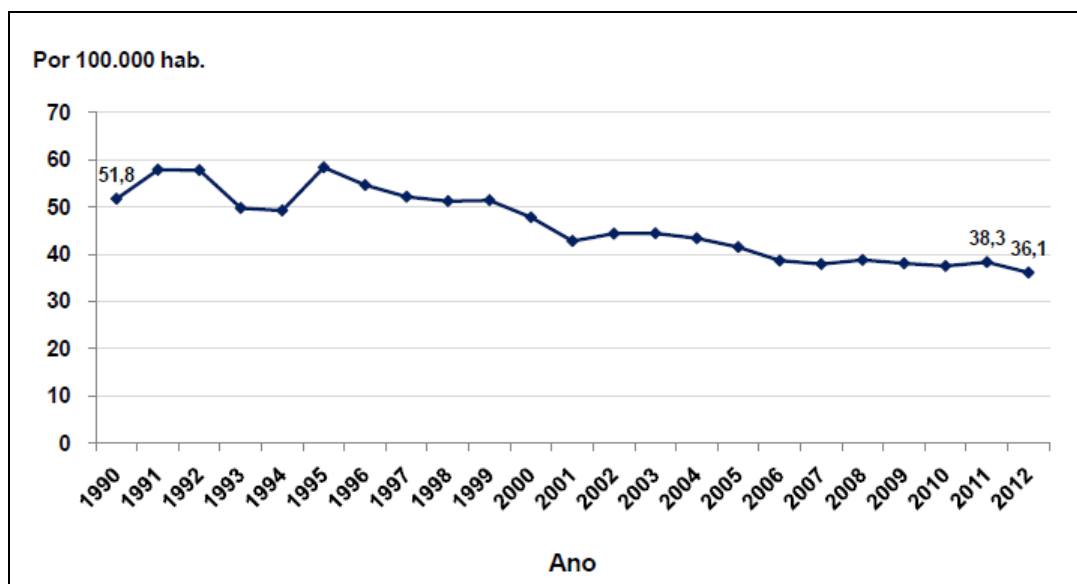


Gráfico 1 - Incidência de TB no Brasil
Fonte: BRASIL, 2013

Apesar de todos os tratamentos e de Programas do Ministério da Saúde para erradicar a tuberculose, a diferença de investimento nas diversas regiões, faz com que alguns estados do Brasil não tenham condições de acompanhar a evolução médica dos outros centros, ocasionando muitas vezes em focos de doenças decorrentes da falta de saneamento e higiene. Nos locais aonde há miséria, fome e desnutrição, há grande possibilidade da doença se desenvolver - como nas regiões norte e nordeste-, bem como também em locais onde há grandes aglomerados humanos - como na região sudeste (BRASIL, 2013).

3.2 Características do agente etiológico

O *Mycobacterium tuberculosis* (MT), também conhecido como bacilo de Koch, não produz toxinas, não forma esporos, não possui flagelos, e tem tamanho aproximado entre 01 e 10 μm de comprimento por 0,2 a 0,6 μm de largura. O MT é um microrganismo aeróbio estrito e intracelular facultativo, podendo ser encontrado no interior do citoplasma parasitando e se multiplicando em células fagocitárias. Além disso, é um bacilo de crescimento fastidioso e possui longo período de duplicação (de 16 a 48 horas), o que dependerá da disponibilidade de oxigênio, de nutrientes e do pH do meio (KRITSKI et al., 2000).

De acordo padronização do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008), o meio de cultura mais adequado para o crescimento do MT é o Löwenstein-Jensen (LJ), em temperatura de 37°C. As colônias, por sua vez, apresentam textura rugosa e coloração creme.

Morfologicamente, o envelope microbiano tem sido apresentado por diversos autores como um modelo esquemático, composto por parede celular, membrana citoplasmática, dentre outros componentes. Sua complexa parede celular é composta majoritariamente por ácidos graxos, como o ácido micólico, que são covalentemente ligados ao arabinogalactano (BRENNAN e NIKAIDO, 1995). Tais ácidos possuem certa afinidade com o corante fucsina, gerando complexos que são responsáveis pela característica tintorial de resistência a descoloração por soluções álcool-ácidas, apresentada por esse microrganismo, que são então designados como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR). Essas características tintoriais e o aspecto morfológico não permitem a diferenciação das espécies micobacterianas, embora algumas se apresentem morfológicamente mais espessas e curvas (BRASIL, 2008). Para a definição da espécie é preciso que os bacilos sejam isolados em meio de cultivo e identificados por testes fenotípicos e/ou moleculares (BRASIL, 2008; DEL PORTILLO, 1991).

3.3 Tratamento

A TB é uma doença grave, porém curável. Se o esquema de tratamento utilizado for adequado, se as doses forem corretas e tomadas regularmente por tempo suficiente, a cura será mais facilmente evidenciada. No Brasil, os esquemas terapêuticos são padronizados e se adequam às diferentes situações clínicas dos pacientes (CAMPOS, 2007).

A terapêutica ideal utilizada na TB combina ação bactericida, prevenção de resistências pelo uso de diversos fármacos, devendo ser feita por um período de tempo suficientemente longo, a fim de evitar falências no tratamento e recaídas (DUARTE *et al.*, 2010).

Os fundamentos da quimioterapia utilizada na TB (poliquimioterapia e longo tempo de tratamento) fundamentam-se nas características do bacilo, na farmacologia, em estudos experimentais e ensaios terapêuticos (CAMPOS, 2007). A escolha do esquema terapêutico se baseia na compreensão da biologia do *M. tuberculosis*, no hospedeiro e nas atividades específicas dos fármacos, e deve levar em conta a prevalência e o padrão de susceptibilidade da TB na comunidade em questão (DUARTE *et al.*, 2010). Levando em consideração a característica de aerobiose estrita do BK, o esquema medicamentoso deve conter fármacos que atuem tanto no pH ácido e no neutro, em altos ou baixos teores de oxigênio e em qualquer grau de atividade metabólica bacteriana (CAMPOS, 2007).

A atividade do medicamento se dá quando o bacilo está metabolicamente ativo, multiplicando-se, porém, devido a sua multiplicação lenta os bacilos persistentes podem passar meses sem atividade metabólica, sendo assim necessário um longo tempo de tratamento. O esquema deve sempre conter duas ou mais drogas para que os bacilos resistentes a determinado fármaco sejam destruídos pelo outro, e vice-versa (CAMPOS, 2007).

A duração mínima de um esquema terapêutico que inclua isoniazida e rifampicina é de 6 meses, mas a determinação sobre a duração do tratamento depende sempre da resposta do doente. Os tratamentos mais prolongados se destinam aos doentes com alto risco de insucesso terapêutico. (DUARTE *et al.*, 2010).

A taxa de abandono do tratamento da TB no Brasil apresenta números consideráveis, o que resulta em risco de resistência e continuação da transmissão da doença. Vários estudos já apontaram fatores que podem favorecer o abandono do tratamento da TB REFERÊNCIA. A não adesão ao tratamento da TB se apresenta como um dos maiores obstáculos enfrentado pelos serviços de saúde para o controle e é possível que a principal implicação da ampliação da cobertura pela Estratégia de Saúde da Família (ESF), seja a redução do abandono do tratamento (BRAGA *et al.*, 2012).

3.3.1 Esquemas terapêuticos

Os esquemas terapêuticos para tratamento da TB são padronizados há 30 anos no país. O esquema terapêutico com três fármacos (rifampicina, isoniazida e pirazinamida) passou por uma fase de mudanças em 2010. Ao esquema anterior foi adicionado o etambutol na sua fase de ataque, e as posologias da isoniazida e da pirazinamida foram reduzidas (Tabela 01). Esta alteração justifica-se principalmente pelo aumento da resistência à isoniazida e a rifampicina, que são considerados os fármacos de primeira linha do tratamento. Além disso, quando o paciente sabidamente possui uma cepa resistente a essas duas principais drogas, o esquema de tratamento é completamente modificado (Tabela 02) (BRASIL, 2010).

Tabela 01- Esquema Básico de Tratamento para Adultos e Adolescentes.

Regime	Fármacos	Faixa de peso	Nº de unidades/doses	Nº de meses
2RHZE Fase intensiva	RHZE Comprimido em dose fixa combinada 150/75/400/275mg	20 a 35kg	2 comprimidos	2
		36 a 50kg	3 comprimidos	
		>50kg	4 comprimidos	
4RH Fase de manutenção	RH Cápsulas ou comprimidos de 300/200mg ou 150/100mg	20 a 35kg	1 comprimido ou cápsula 300/200mg	4
		36 a 50kg	1 comprimido ou cápsula de 300/200mg + 1 comprimido ou cápsula de 150/100mg	
		>50kg	2 comprimidos ou cápsulas de 300/200mg	

Siglas: R (rifampicina); H (isoniazida); Z (pirazinamida); E (etambutol).
Fonte: BRASIL, 2010.

Tabela 02: Esquema de Tratamento para Multirresistência

Regime	Fármacos	Doses por faixa de peso				Nº de meses
		Até 20kg	21 a 35 kg	36 a 50 kg	Mais que 50 kg	
2S5ELZT 1ª Etapa Fase intensiva	Estreptomina	20mg/kg/dia	500mg/dia	750 a 1.000mg/dia	1.000mg/dia	2
	Etambutol	25mg/kg/dia	400 a 800mg/dia	800 a 1.200mg/dia	1.200mg/dia	
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250 a 500mg/dia	500 a 750mg/dia	750mg/dia	
	Pirazinamida	35mg/kg/dia	1.000mg/dia	1.500mg/dia	1.500mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia	750 a 1.000mg/dia	
4S3ELZT 2ª Etapa Fase intensiva	Estreptomina	20mg/kg/dia	500mg/dia	750 a 1.000mg/dia	1.000mg/dia	4
	Etambutol	25mg/kg/dia	400 a 800mg/dia	800 a 1.200mg/dia	1.200mg/dia	
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250 a 500mg/dia	500 a 750mg/dia	750mg/dia	
	Pirazinamida	35mg/kg/dia	1.000 mg/dia	1.500mg/dia	1.500mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia	750 a 1.000mg/dia	
12 ELT Fase de manutenção	Etambutol	25mg/kg/dia	400 a 800mg/dia	800 a 1.200mg/dia	1.200mg/dia	12
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250 a 500mg/dia	500 a 750mg/dia	750mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia	750 a 1.000mg/dia	

Fonte: BRASIL, 2010.

3.3.2 Isoniazida (INH)

A isoniazida (Figura 01) é classificada como o mais potente quimioterápico utilizado no tratamento da TB, não apenas em comparação aos fármacos da primeira linha de tratamento, mas também quando comparado a todos os outros utilizados para a destruição das micobactérias. Isso acontece por que ela apresenta diferentes mecanismos de ação no microrganismo, que vão desde destruição e inibição da parede celular, até a perda de macromoléculas do microrganismo, como por exemplo, o seu ácido desoxirribonucleico (DNA) (VILCHEZE e JACOBS, 2007).

A isoniazida é a hidrazida do Ácido nicotínico, solúvel em água (SILVA, 2010).

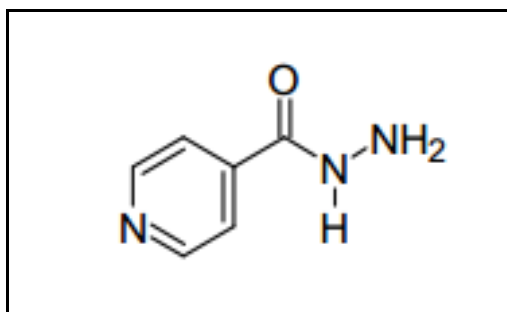


Figura 01 - Fórmula Estrutural da Isoniazida
Fonte: LAVOR, 2010

3.3.2.1 Mecanismo de Ação

A isoniazida é um pró-fármaco; ou seja, é necessária a sua conversão em metabólito ativo através da catalase-peroxidase micobacteriana. Uma ação primária da isoniazida consiste em inibir a síntese de ácidos micólicos – lipídeos longos e ramificados que estão fixados a um polissacararídeo singular, o arabinogalactana, formando parte da parede celular das micobactérias. O mecanismo de ação da isoniazida é complexo, e a resistência está associada a mutações em pelo menos cinco genes diferentes (*katG* – codifica a catalase-peroxidase que ativa o pró-fármaco isoniazida, *inhA*, *ahpC*, *kasA* e *ndh*). A maior parte das evidências indica ser o *inhA* o alvo principal do fármaco (GOODMAN E GILMAN, 2006).

Os ácidos micólicos são peculiares das micobactérias, o que explica o elevado grau de seletividade da atividade antimicrobiana da isoniazida. As mutações do gene *katG*, que resultam em inatividade da catalase-peroxidase, produzem um elevado nível de resistência à

isoniazida, visto que o pró-fármaco não pode ser ativado pela catalase-oxidase (GOODMAN E GILMAN, 2006)

A isoniazida também inibe a catalase-peroxidase micobacteriana (a enzima de ativação da isoniazida), o que pode aumentar a probabilidade de lesão às micobactérias por espécies reativas de oxigênio e H_2O_2 . A exposição à isoniazida leva a uma perda da resistência ao ácido e diminuição da quantidade de lipídios extraídos por metanol nos microrganismos (GOODMAN E GILMAN, 2006).

A INH e RMP parecem ter um efeito sinérgico ou aditivo, contribuindo para a hepatotoxicidade. Um possível mecanismo é o agravamento da toxicidade hepática causada pela acetilhidrazina, hidrazina e compostos resultantes da ação enzimática no metabolismo hepático (YEN & LEUNG, 2006).

3.3.3 Rifampicina (RMP)

A Rifampicina (Figura 02) é um derivado do 3,4(metilpiperazinil-iminometildine)-rifampicina, é lipossolúvel, e solúvel em solventes orgânicos e em água em pH ácido.

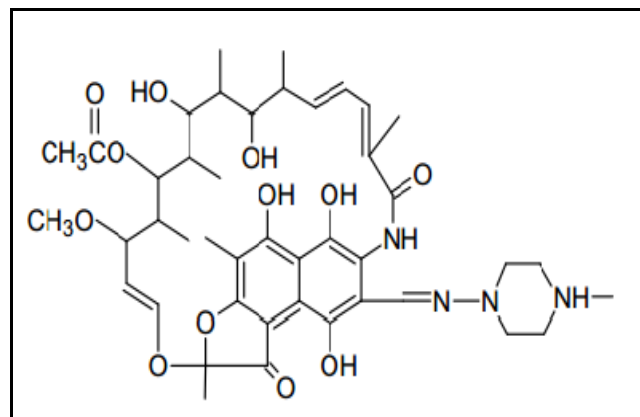


Figura 02 - Fórmula Estrutural da Rifampicina
Fonte: LAVOR, 2010

3.3.3.1 Mecanismo de Ação

A rifampicina inibe a RNA-polimerase das micobactérias e de outros microrganismos através da formação de um complexo fármaco-enzimático estável, levando a supressão da iniciação da formação da cadeia (mas não de seu alongamento) na síntese de RNA. Mais especificamente, a subunidade β dessa enzima complexa constitui o local de ação da

rifampicina, apesar de o fármaco ligar-se apenas a haloenzima (GOODMAN E GILMAN, 2006).

3.4 Influência genética na resistência aos fármacos

As bactérias obtêm resistência a diferentes drogas através de diferentes mecanismos biológicos, tais como descritos em três categorias por Telenti (1997): Mecanismos de barreira (diminuição da permeabilidade e a presença de bombas de efluxo); degradação ou inativação de enzimas (como a β -lactamase); e a modificação do alvo de ação das drogas (como o aparecimento de mutação simples no gene-chave). De acordo com o mesmo autor, tais características podem ser adquiridas ou herdadas através de elementos genéticos exógenos móveis (como os plasmídeos ou transposons) ou mutações do próprio cromossomo microbiano.

As micobactérias, por sua vez, não são muito diferentes quando comparadas as outras bactérias. Diferem-se sim, nas características observadas em sua parede celular, apresentando peculiaridades a esse microrganismo, e, por conseguinte, resistência intrínseca a diversos fármacos (NIKAIDO, 1994). Enzimologicamente sabe-se que a β -lactamase funciona como uma eficiente degradadora enzimática, modificando dessa forma a ação de algumas drogas (NIEDERWEIS, 2003).

No aspecto molecular, esses mecanismos ainda não estão evidentemente estabelecidos, principalmente no que diz respeito aos processos que comumente intermediam a resistência a multidrogas, comparado-as com outros microrganismos no que se refere aos elementos genéticos exógenos (DAVID, 1980).

Sendo assim, acredita-se que o emergente surgimento de cepas resistentes a drogas ocorreram pela pré-existência de mutações randômicas, e não simplesmente por causa de exposições anteriores ao medicamento. De fato, os antibióticos não predispõem o surgimento, mas sim a seleção das cepas resistentes (TELENTI, 1997; MARTILLA e SOINI, 2003).

O fato é que tais mutações não estão diretamente ligadas a um principio cardinal, isso é, ocorrem de forma aleatória, no que diz respeito a atual quimioterapia utilizada para a tuberculose. Podem-se citar como exemplo, mutações causando resistência concomitante a INH e RMP ao mesmo tempo, apresentando uma frequência mutagênica de um para cada 10^8 e 10^9 replicações bacterianas, respectivamente. Dessa forma, para que se tenha o surgimento de uma cepa multirresistente, a probabilidade desse fato ocorrer será de um para cada 10^{16} divisões celulares (MARTILLA e SOINI, 2003).

Por causa do emergente aumento de cepas resistentes aos antibióticos utilizados no tratamento a tuberculose – em especial a INH -, trabalhos vem sendo realizados nos últimos anos, objetivando melhor compreensão dos mecanismos de resistência e a identificação dos genes envolvidos. Um resumo dos principais genes ligados a produção de cepas resistentes a INH, estão apresentados na Tabela 03.

Tabela 03 - Genes relacionados à produção de cepas resistentes/sensíveis no *M. tuberculosis*.

Genes Envolvidos na Resistência	Frequência de Mutações Associadas à Resistência	Mecanismo de Resistência
(I) <i>katG</i> (Catalase-Peroxidase)	29 a 100%	Sua mutação resulta em falência no processo de ativação da INH
(II) <i>rpoB</i> (β subunidade do RNA polimerase)	52 a 95%	Inibição da transcrição
(III) <i>inhA</i> (Enoil-ACP Redutase)	21 a 34%	Expressão do gene permite a síntese do ácido micólico
(IV) <i>ahpC</i> (Alquil Hidroperóxido Redutase)	10 a 15%	Mutações podem servir apenas como marcador para lesões no <i>katG</i>
(V) <i>tbnaT</i> (Arimina N-Acetil Transferase)	0 a 43%	Remoção da INH ativada do microrganismo. A mutação produz cepas sensíveis e não resistentes

Fonte: Douglas e Mcleod, 1999; Palomino et al., 2007; Kremer et al., 2002; Brennan e Nikaido, 1995.

3.5 Métodos diagnósticos convencionais da tuberculose

O diagnóstico precoce é importante para minimizar a transmissão e reduzir a morbidade e mortalidade da TB. O diagnóstico clínico é muitas vezes difícil, devido aos sintomas inespecíficos e frequentemente insidiosos, além de apresentação radiológica que pode ser muito diversificada. Atualmente, o diagnóstico dessa doença ainda depende de

exames microbiológicos, que geralmente requerem um manuseio cuidadoso e um transporte rápido da amostra. Apesar de a baciloscopia apresentar um diagnóstico presuntivo rápido, o método *Gold-standard* para diagnóstico ainda é o isolamento cultural do *Mycobacterium tuberculosis*, o qual pode durar de 60 a 90 dias (BRASIL, 2013).

O diagnóstico laboratorial se dá através da combinação de diferentes métodos, o que requer tempo até se obter um resultado. Os mais utilizados são os bacterioscópicos (baciloscopia e cultura), Raio-X, prova tuberculínica, anatomopatológico (histológico e citológico) e biologia molecular (BRASIL, 2013).

3.5.1 Baciloscopia e Cultivo

A baciloscopia direta do escarro é o método inicialmente solicitado, pois permite descobrir a fonte mais importante de infecção, que é o doente bacilífero. Executado de forma correta, este permite detectar de 70-80% dos casos de TB pulmonar em uma comunidade. Por ser um método simples e seguro, deve ser realizado por todos os laboratórios (SBPT, 2009).

As secreções brônquicas são o produto frequentemente enviado ao laboratório, perante suspeita de TB pulmonar. O doente deve ser instruído sobre o método adequado de colheita de expectoração, bem como a proceder com o rápido transporte para o laboratório, ou caso tal não seja possível, proceder ao seu acondicionamento a uma temperatura de 4 a 5°C, por um período de no máximo cinco dias. A amostra deverá ser colhida para um frasco esterilizado de boca larga e com tampa de enroscar, de modo a que não ocorram derrames (BENTO *et al.*, 2011).

O exame micobacteriológico direto não confirma o diagnóstico de TB, já que outras micobactérias também são álcool-ácido resistentes. Porém, o exame cultural é o único método que confirma a viabilidade das micobactérias. Mesmo nos casos assintomáticos, ou com radiografia de tórax normal, um resultado de cultura positivo define um caso ativo, com necessidade de tratamento, uma vez excluída a possibilidade de contaminação da amostra por MT (BENTO *et al.*, 2011).

A cultura permite a identificação do *M. tuberculosis* e a realização do teste de sensibilidade, além de aumentar o rendimento diagnóstico em 20-40%. Os meios sólidos mais recomendados são o Löwenstein-Jensen e o Ogawa-Kudoh. Esse último é recomendado para a utilização nos laboratórios de menor complexidade porque não necessitado uso de centrífuga. A cultura em meio sólido tem como limitação o tempo do resultado (2-8 semanas). Por isso,

quando possível, deve ser utilizado o meio líquido através de sistemas automatizados não radiométricos (resultados em 10-40 dias) (SBPT, 2009).

3.5.2 Métodos Radiográficos

A radiografia de tórax é um método diagnóstico de grande importância na suspeita de TB. Diferentes achados radiológicos apontam para suspeita de doença em atividade ou doença no passado, além do tipo e extensão do comprometimento pulmonar. Deve ser solicitada para todo o paciente com suspeita clínica de TB pulmonar. No entanto, até 15% dos casos de TB pulmonar não apresentam alterações radiológicas, principalmente pacientes imunodeprimidos (BRASIL, 2010).

A TB pulmonar do adulto se apresenta como um infiltrado focal dos lobos superiores, geralmente dos segmentos apical e posterior ou do segmento apical do lobo inferior. As cavitações, o padrão miliar, as adenopatias, o derrame pleural e as atelectasias (particularmente na criança), são outras possíveis alterações radiológicas encontradas na TB (BENTO *et al.*, 2011).

3.5.3 Prova Tuberculínica (PPT)

A PPT consiste na inoculação intradérmica de um derivado proteico do *M. tuberculosis* para medir a resposta imune das células a estes antígenos. É utilizada, nas pessoas (adultos e crianças), para o diagnóstico de infecção latente pelo *M. tuberculosis*. Na criança também é muito importante como método coadjuvante para o diagnóstico da TB (BRASIL, 2010).

São utilizados antígenos purificados ou clonados, em metodologias que se baseiam em reações antígeno-anticorpo. São métodos rápidos, mas que têm o inconveniente de, em função da baixa especificidade dos antígenos disponíveis, revelar reações cruzadas, além de outras circunstâncias que alteram os resultados. Além disso, ainda não é possível, com absoluta segurança, identificar os doentes dos apenas infectados ou vacinados (SBPT, 2009).

3.5.4 Método histopatológico

A histopatologia é empregada na investigação das formas extrapulmonares, ou nas formas pulmonares que se apresentam radiologicamente como doença difusa como, por

exemplo, na TB miliar, ou em indivíduos imunossuprimidos. Nos pacientes não imunossuprimidos, a baciloscopia do tecido usualmente é negativa, e a presença de um granuloma, com necrose de caseificação, é compatível com o diagnóstico de TB (BRASIL, 2010).

Nos pacientes imunossuprimidos, é menos frequente a presença de granuloma com necrose caseosa, mas é mais frequente a positividade da baciloscopia no material de biópsia. No entanto, o único método diagnóstico de certeza de TB é a cultura seguida da confirmação da espécie *M. tuberculosis* por testes bioquímicos ou moleculares e, por isso, todo material coletado por biópsia deve também ser armazenado em água destilada ou soro fisiológico 0,9% e enviado para cultura em meio específico (BRASIL, 2010).

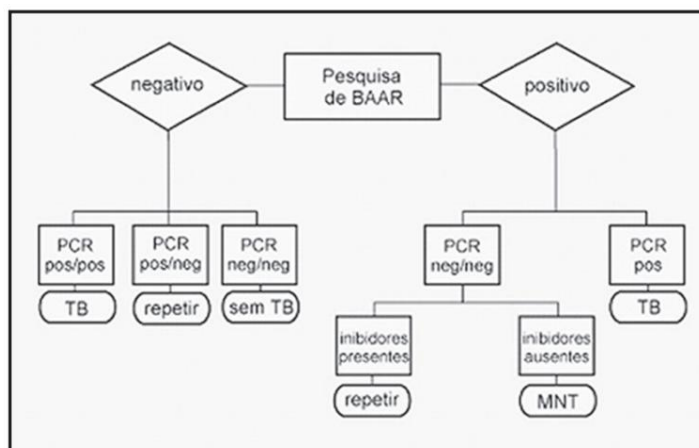
3.6 Métodos diagnósticos moleculares da tuberculose

Os avanços tecnológicos da genética e biologia molecular permitiram ao longo dos anos, o desenvolvimento de diferentes tipos de diagnósticos moleculares para diversas doenças infecciosas. A identificação de mutações em genes associados à resistência aos fármacos da tuberculose é uma das vertentes alvos desses diagnósticos, pois priorizam o menor tempo na entrega de resultados, e altos percentuais de sensibilidade e especificidade. Apesar disso, as bases genéticas da resistência ainda não estão bem elucidadas quanto a totalidade dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose (ROSSETI *et al*, 1997). Mokrousov *et al* (2002) descreveu em seus estudos análises das frequências de mutações em genes envolvidos nos mecanismos de resistência à isoniazida, e concluiu em existir significativa correlação entre a expressão de proteínas modificadas por mutações pontuais em genes como o *katG*, com o fenótipo de resistência no *Mycobacterium tuberculosis*. Essas constatações serviram como base para a padronização e utilização dos métodos moleculares no diagnóstico de resistência aos fármacos da tuberculose, tais como o PCR-RFLP, o PCR em tempo real, o PCR-SSCP, o DNA-Microarray e o sequenciamento.

3.6.1 PCR (Reação de Polimerização em Cadeia)

A PCR é uma técnica largamente utilizada no mundo, descrita por Kary Mullis em 1983, baseada na amplificação de uma curta região do DNA, que no caso do diagnóstico da tuberculose, são adicionados *primers* específicos para a detecção do *M. tuberculosis*. Amostras de escarro, urina, biópsia, saliva e cultura podem ser coletadas para extração e

amplificação do DNA, dependendo do objetivo da análise diagnóstica. A PCR tem sido um importante método para identificação de diagnóstico falso-negativo da tuberculose ou de *Mycobacterium não tuberculosis* (MNT) em métodos convencionais, como demonstrado na Figura 03. (SIQUEIRA *et al*, 2009).



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

Figura 03 - Quadro de regras do CDC para diagnóstico da tuberculose por PCR.

3.6.2 PCR em tempo real

Baseada na PCR convencional, a PCR em tempo real é uma técnica mais robusta que objetiva a amplificação de uma região do DNA através de sondas específicas e com a visualização do resultado enquanto ocorrem as reações ainda no termociclador.

Em 2011 o Ministério da Saúde do Brasil, anunciou no Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde (BRATS) a possibilidade de adotar o teste Xpert® MTB/RIF ou GeneXpert, como método diagnóstico molecular da resistência ao fármaco rifampicina utilizado no tratamento da tuberculose. O referido método foi padronizado pela FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics), e baseia-se na integração e automatização das etapas de preparação da amostra, amplificação de região do gene *rpoB* por PCR em tempo real e detecção de mutações no códon 531 desse gene. Entretanto, suas principais limitações são o alto custo e a recorrência da necessidade de repetição das análises.

3.6.3 PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Técnica utilizada para identificação de mutações em regiões do DNA através da comparação do padrão de bandas com linhagens selvagens, em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, após corrida em cuba de eletroforese (TELENTI *et al*, 1993). Esse método pode ter resultados alterados por mudanças no pH das soluções utilizadas na eletroforese ou na variação da voltagem e amperagem do aparelho, que modificam o padrão de bandas a serem analisadas.

3.6.4 DNA-Microarray

Técnica baseada na hibridização de fragmentos de DNA em sondas específicas fixadas em microchips de oligonucleotídeos dispostos em lâminas, que são analisados através de softwares. É um método rápido e eficiente, entretanto necessita de capacitação elevada e é bastante onerosa (SKONIKOVA *et al*, 2003).

3.6.5 Sequenciamento

Método baseado em PCR, permitindo conhecer toda a sequência de nucleotídeos de determinada região do DNA, e, portanto, detectar mutações conhecidas e não conhecidas ao comparar com uma sequência de referência. O sequenciamento é significativamente sensível, eficaz e confiável, sendo considerada *gold standart* no diagnóstico molecular. Entretanto, é bastante onerosa, pois utiliza equipamentos e reagentes de alto custo (SOINI & MUSSER, 2001). No diagnóstico da resistência aos fármacos da tuberculose, diversos autores utilizam essa técnica para validação dos resultados encontrados em outros métodos moleculares, tais como POST *et al* (2004) e SILVA *et al* (2003).

3.6.6 INNO-LiPA®

Teste colorimétrico baseado na amplificação do gene *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis* e posterior hibridização reversa do produto amplificado com sondas específicas em membrana de nitrocelulose. É comercializado pela empresa Innogenetics (Ghent, Bélgica), fornece o resultado em até 24 horas, de fácil execução, entretanto é de alto custo e não está disponível no Brasil (TORTOLI & MARCELLI, 2007).

3.6.7 GenoType MTBDR^{plus}®

Esse método tem a proposta mais próxima com o deste trabalho, pois visa identificar a resistência aos fármacos isoniazida e rifampicina, através de ensaio molecular que detecta mutações nos genes *katG*, *rpoB* e *inhA*. Entretanto, o GenoType MTBDR^{plus}®, comercializado pela empresa Hain Lifescience (Nehren, Alemanha), é uma técnica colorimétrica baseada na hibridização reversa de produto amplificado do genoma da micobactéria a partir de amostras de cultura ou clínica, com sondas específicas, identificando além da resistência, o complexo *M. tuberculosis*. O teste possui um custo elevado e não está disponível no Brasil (SOMOSKOVI *et al*, 2006).

3.6.8 PCR-RFLP

Com o foco no diagnóstico de resistência aos fármacos do tratamento da tuberculose, a PCR pode ser associada ao método de RFLP (Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição), que através de restrições enzimáticas do amplificado de DNA, identifica mutações pontuais nos genes analisados. Os amplificados após restrição são aplicados em gel de agarose e submetidos em eletroforese para separação e visualização dos diferentes fragmentos gerados. Ramaswamy *et al* (1998) e Hazbon *et al* (2005) descreveram a utilização do método de PCR-RFLP para o diagnóstico de resistência na tuberculose, além de comparar e confirmar os resultados obtidos com o método de sequenciamento.

4 - Materiais e Métodos

4.1 Obtenção e Seleção das cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Foram coletadas 94 amostras de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes (52) e sensíveis a INH (42), selecionadas de um total de 581 isolados clínicos diagnosticados e conservados na micobacterioteca do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz, do estado da Bahia (LACEN-BA). Foram utilizados os seguintes critérios de seleção: serem microrganismos advindos de espécimes clínicos e de origem pulmonar (tuberculose pulmonar, e não ectópica); terem sido diagnosticados no ano de 2007; e se conhecer previamente os resultados do seu antibiograma. A linhagem padrão H37Rv foi utilizada como

controle. Do total de isolados, 259 cepas mostraram resistência a INH, enquanto que 322 foram sensíveis a esse mesmo fármaco. Das cepas resistentes, foram utilizados 19,3% (INHR) e 15,5% daquelas que apresentaram sensibilidade a INH (INHS). Foi analisada também nesse estudo o gênero do paciente que havia fornecido a amostra ao LACEN-BA para avaliação deste como fator de risco para a tuberculose.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Santa Cruz (CEP-UESC) através do protocolo 190/08, no qual foram submetidos à análise os projetos que utilizaram as mesmas amostras coletadas no ano de 2008.

4.2 Cultura, Identificação e Teste de Sensibilidade

As cepas selecionadas foram repicadas, cultivadas e avaliadas novamente para confirmação dos testes feitos pelo LACEN. Para a identificação e o cultivo adequados do *Mycobacterium tuberculosis*, foram utilizados todos os critérios preconizados pelo Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008). Portanto, as cepas foram inoculadas em meio Löwenstein-Jensen (LJ), onde se realizou os testes em meio ácido p-nitrobenzóico (500µg/mL) e o de Niacina.

O teste de sensibilidade aos diferentes fármacos foi realizado utilizando-se o Método das Proporções em LJ, sendo empregadas as seguintes concentrações para cada droga: 0,2µg/mL de Isoniazida (INH); 40µg/mL de Rifampicina (RMP); 2µg/mL de Etambutol (EMB); e 4µg/mL de Estreptomicina (ST).

Todos os testes para a obtenção final das cepas desejadas nesse estudo foram realizados no Laboratório de Micobacteriologia do LACEN-BA - referência estadual em identificação e cultivo destes microrganismos.

4.3 Técnica de Extração do DNA do *Mycobacterium tuberculosis*

Após o cultivo e da reavaliação das cepas em estudo, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Micobacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – NB3, localizado na cidade de Salvador, Bahia, onde foram processadas as extrações de DNA total. Para a realização deste procedimento, foi utilizado o manual de laboratório intitulado *Mycobacterium tuberculosis* Protocols (Parish e Stoker, 2001).

4.4 Eletroforese da extração do DNA

Para verificação da integridade do DNA extraído, uma alíquota diluída de 5 μL do mesmo foi transferida para um gel de agarose a 2%, acrescido de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), submetidas a uma corrente de 100V em uma cuba de eletroforese por 20 minutos. O gel foi fotografado em fotodocumentador da marca Kodak Digital (*Science Electrophoresis Documentation Analysis System - EDAS 120*), empregando luz ultravioleta (UV).

4.5 Quantificação do DNA das amostras

O DNA extraído foi diluído a 1:70 e quantificado por leitura de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro gene-QuantII (Pharmacia Biotech) no comprimento de onda $\lambda = 260 \text{ nm}$.

4.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O método de PCR foi padronizado e processado utilizando as diluições e concentrações apresentadas na tabela 04.

Essa técnica foi empregada para a amplificação da região pertencente aos códons 315 do gene *katG* e 531 do gene *rpoB*, e da região promotora do gene *inhA*, sendo o produto final utilizado na reação subsequente, o Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP). O protocolo e os ciclos do PCR estão detalhadamente explicados na tabela 05. As sequências dos *primers* estão apresentadas na tabela 06.

Tabela 04 - Esquema utilizado para a realização do PCR.

Reagentes	Concentração Final	Quantidade para 1A*
Água	-	16,55 μL
Tampão da <i>Taq</i>	1X	2,5 μL
MgCl ₂	1.5 mM	0,75 μL
dNTPs	0.2 mM	2,0 μL
Primer F	1 pM/ μL	1,0 μL
Primer R	1 pM/ μL	1,0 μL
<i>Taq</i> Polimerase	1U	0,20 μL
DNA	50 a 300 ng/ μL	0,5 μL

*1A= 01 amostra

Tabela 05 - Passos utilizados para a amplificação do fragmento de interesse.

PASSOS	<i>katG</i>	<i>rpoB</i> e <i>inhA</i>
Desnaturação 1	94 °C por 4 minutos	95 °C por 5 minutos
Desnaturação 2	94 °C por 1 minuto	95 °C por 30 segundos
Anelamento	59,7 °C por 1 minuto	64 °C por 30 segundos
Extensão	72 °C por 1 minuto	72 °C por 1 minuto
Extensão Final	72 °C por 4 minutos	72 °C por 7 minutos
Hold (quando necessário)	15 °C por tempo indeterminado	15 °C por tempo indeterminado

4.7 Eletroforese dos produtos de PCR

Após a amplificação, a existência e a qualidade dos fragmentos de DNA das amostras foram avaliados ao realizar eletroforese em gel de agarose a 2% acrescido de brometo de etídio (0,5µL/mL), submetidas a uma corrente de 100V por 20 minutos. O gel foi fotografado em fotodocumentador Kodak Digital (*Science Electrophoresis Documentation Analysis System* - EDAS 120), empregando luz UV.

4.8 Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP)

Após a obtenção do amplificado, foram utilizadas diferentes enzimas de restrição, sendo que para o códon 315 do gene *katG*, foram utilizadas as enzimas MspI e SatI, enquanto que para o códon 531 do gene *rpoB* e para região promotora do *inhA*, utilizou-se apenas BsmAI (HAZBON, 2006).

As características de identificação de mutações de cada uma das enzimas estão apontadas na tabela 06.

Tabela 06 - Características peculiares dos Primers e das Enzimas de Restrição utilizadas no atual trabalho.

Gene	Primer	Fragmento*	Enzima	Mutação
<i>katG</i>	F 5' – 3' AGCTCGTATGGCACCGGAAC	620pb	MspI	315 AGC→ACC
	R 5' – 3' TTGACCTCCCACCCGACTTG			315 AGC→GGC
			SatI	315 AGC→ACC
				315 AGC→AAC
				315 AGC→ACA
		315 AGC→GGC		
<i>inhA</i>	F 5' – 3' - CGCAGCCAGGGCCTCGCTG R 5' - 3' - CTCCGGTAACCAGGACTGA	246pb	BsmAI	-5 GAC→GAT
<i>rpoB</i>	F 5' – 3' - ACCGCAGACGTTGATCAACAT R 5' - 3' - GGCACGCTCACGTGACAG	350pb	MspI	CGA→CAA

* Frag.: Tamanho do fragmento do PCR.

Fonte: RAMASWAMY *et al*, 1998; HOLFING *et al*, 2005;

As reações (mix) do RFLP foram realizadas conforme apresentadas na tabela 07:

Tabela 07 - Reagentes utilizados para o preparo da reação (mix) de RFLP.

Reagente	Concentração Final	Quantidade para 1A*
Água Ultra Pura	-	3,5 µL
Tampão da Enzima	1X	2,5 µL
Enzima de Restrição	5.000U/ml	0,25 µL

*1A= 01 amostra

Após o preparado, foram distribuídas alíquotas contendo 6,25 µL em cada mix, para cada microtubo com 20 µL do amplificado da PCR. Em seguida, o mesmo foi levado ao banho-maria com temperatura regulada em 37 °C, variando o tempo para cada uma das enzimas, como apresentado pela Tabela 08.

Tabela 08 - Diferentes tempos utilizados para cada reação (RFLP).

Gene	Enzima	Tempo de Incubação
<i>katG</i>	MspI	5 horas
<i>katG</i>	SatI	16 horas
<i>rpoB</i>	MspI	5 horas
<i>inhA</i>	BsmAI	5 horas

4.9 Eletroforese do produto de RFLP

Após a digestão, os fragmentos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% acrescido de brometo de etídio (0,5µL/mL) a uma corrente de 95 Volts por 40 minutos. O gel foi fotografado em fotodocumentador Kodak Digital (*Science Electrophoresis Documentation Analysis System - EDAS 120*), empregando luz UV.

Para a análise do gel, observou-se o peso molecular dos fragmentos resultantes, diferenciando as amostras em cepas selvagens ou mutantes. Tal avaliação normalmente é de fácil reconhecimento, de acordo Marttila e Soini (2003), visto que após a fragmentação enzimática do DNA amplificado, serão apresentadas bandas com pesos moleculares e padrões de corridas bem diferenciados.

4.10 Sequenciamento das Amostras

As 94 amostras de DNA extraídas de cultura foram amplificadas no Laboratório de Biologia Molecular da Seção de Bacteriologia e Micologia (SEBAC) do Instituto Evandro Chagas (IEC) em Belém, Estado do Pará.

4.10.1 Reações de PCR, Eletroforese e Purificação

As reações de sequenciamento foram precedidas de amplificação do DNA através da técnica de PCR descrita na Tabela 05 acrescentando DNTPs marcados do *BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit*, da empresa Applied Biosystems®, eletroforese (conforme item 3.7) e purificação dos produtos amplificados utilizando o *Big Dye® X Termination Purification Kit*, da mesma empresa, conforme instruções do fabricante REFERÊNCIA. As sequências de primers utilizados nessa PCR estão descritos na Tabela 09.

Tabela 09 – Sequências dos primers utilizados na PCR pré-sequenciamento

Gene	Primer	Fragmento*
<i>katG</i>	F 5' – 3' GCAGATGGGGCTGATCTACG	555pb
	R 5' – 3' AACTCGTCGGCCAATTCCTC	
<i>inhA</i>	F 5' – 3' - CGCAGCCAGGGCCTCGCTG	246pb
	R 5' - 3' - CTCCGGTAACCAGGACTGA	
<i>rpoB</i>	F 5' – 3' - CGACCACTTCGGCAACCG	342pb
	R 5' - 3' - TCGATCGGGCACATCCGG	

* Frag.: Tamanho do fragmento do PCR.

4.10.2 Sequenciamento do DNA para validação do PCR-RFLP

Os produtos amplificados e purificados foram submetidos à corrida de sequenciamento no equipamento 3130 Genetic Analyzer, da Applied Biosystems®.

4.11 Diagnóstico molecular através do escarro e de lâminas de esfregaço

Foram colhidas 20 amostras de escarro e 20 lâminas de esfregaço de pacientes com baciloscopia positiva para tuberculose, provenientes dos municípios de Itabuna e Ilhéus, no sul do estado da Bahia, para validação do método de diagnóstico molecular proposto por esse

trabalho. As amostras foram solubilizadas e tiveram seu DNA extraído através do método adaptado do descrito por Assis *et al.* (2006).

Para confirmação da presença de DNA de *M. tuberculosis* nas amostras, foi realizada PCR com amplificação da sequência de inserção IS6110 (BOLELLA *et al.*, 1999). Além dessa, foram executadas as reações de PCR-RFLP para os genes *katG*, *inhA* e *rpoB*.

Essas amostras não foram submetidas ao método de sequenciamento, já que a técnica de PCR-RFLP já havia sido padronizada e validada anteriormente.

4.12 Avaliação estatística dos dados

Todos os resultados (realizados em duplicata) foram incluídos em tabela de Microsoft Office Excel® e analisados com auxílio da ferramenta estatística SPSS®, versão 10.

De acordo com cada resultado encontrado, utilizou-se diferentes testes estatísticos: Qui-Quadrado e Coeficiente de Contingência; cuja aplicação, dependendo das condições de cada avaliação, ocorreu isoladamente ou em conjunto. Sendo que, os resultados que tiveram $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A sensibilidade e a especificidade da técnica de PCR-RFLP foram calculadas para prever a existência de resistência.

5 – Resultados e Discussão

5.1 Teste de sensibilidade e gênero do grupo amostral

Os resultados dos testes de sensibilidade (antibiograma) realizados nos isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* (MT) coletados, estão apresentados na tabela 10, apresentando as frequências de resistência e sensibilidade a cada fármaco do tratamento da tuberculose.

Tabela 10 - Frequências de isolados clínicos resistentes aos antibióticos do tratamento da tuberculose.

	ANTIBIÓTICOS TESTADOS NO ANTIBIOGRAMA N°(%)					
	INH	EMB	RMP	ST	PZA	ETH
Resistentes (52)	52(100)	28(53.85)	41(78.84)	25(48.77)	3(5.77)	5(9.62)
Sensíveis (42)	42(100)	42(100)	42(100)	6(11.54)	42(100)	42(100)

Siglas: Isoniazida - INH, Rifampicina - RMP, Etambutol - EMB, Pirazinamida - PZA, Estreptomicina - ST e Etionamina - ETH.

Dentre os 94 isolados clínicos coletados, 73,4% (69) eram provenientes de pacientes do sexo masculino, e 26,6% (25) do sexo feminino. Avaliou-se também, a relação entre o gênero dos pacientes e a infecção por cepas de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes à INH. Dessa forma, a frequência de tísicos do sexo masculino com MT resistente foi de 80,77% (55), sendo do sexo feminino. Estes resultados concordam com as hipóteses de outros estudos (SOUZA *et al.*, 2006; BARROSO *et al.*, 2003) de que ser do gênero masculino é um fator de risco tanto para contrair a tuberculose, como para a infecção pelo MT resistente. Entretanto, devem-se considerar fatores importantes como: ocupação, etnia, abandono e desfecho de tratamento, zona de residência (rural ou urbana), casos novos ou recidivos, dentre outros, pois o gênero isoladamente não é um fator de risco ou de proteção significativo para contrair cepas resistentes de MT.

5.2 PCR-RFLP e Sequenciamento

5.2.1 Frequência de mutação nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB*

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados referentes à correlação da frequência de mutação por gene encontrada nas amostras analisadas sensíveis e resistentes.

Tabela 11 - Correlação da distribuição do número e frequência de cepas resistentes e sensíveis avaliadas por ferramentas moleculares.

			Cultura	
			Resistente	Sensível
PCR-RFLP	<i>katG</i>	Mutante	24(46.15%)*	0
		Selvagem	28(53.85%)*	42(100%)
		Total	52	42
	<i>rpoB</i>	Mutante	27 (51,92%)	0
		Selvagem	25 (48,08%)	42 (100%)
		Total	52	42
	<i>inhA</i>	Mutante	12 (23.08%)*	0
		Selvagem	40 (76.92%)*	42 (100%)
		Total	52	42

Legenda: * P <0.0001 para o teste do χ^2

Do total de isolados clínicos resistentes analisados nesse trabalho, 46,2% foram identificadas como mutantes quando utilizada a enzima *SatI* no método de RFLP, sendo esse mesmo percentual encontrado para a *MspI*. Através desse trabalho, foi possível padronizar a identificação dos mutantes e selvagens através do PCR-RFLP (Figura 04).

Ao comparar as diferentes mutações que podem ser identificadas no códon 315 do *katG* pelas enzimas que foram utilizadas, é possível afirmar que as cepas mutantes apresentam apenas duas possíveis mudanças de base nucleotídicas, sendo elas AGC→ACC e/ou AGC→GGC. Possivelmente, as outras duas mutações adicionais que são identificadas pela *SatI* (AGC→AAC e AGC→ACA) apresentam baixa frequência ou inexistente para a população de cepas de MT isoladas no estado da Bahia. Através do sequenciamento, foi possível corroborar essa hipótese, visto que nesse códon ocorreram apenas as mutações pontuais AGC→ACC e/ou AGC→GGC.

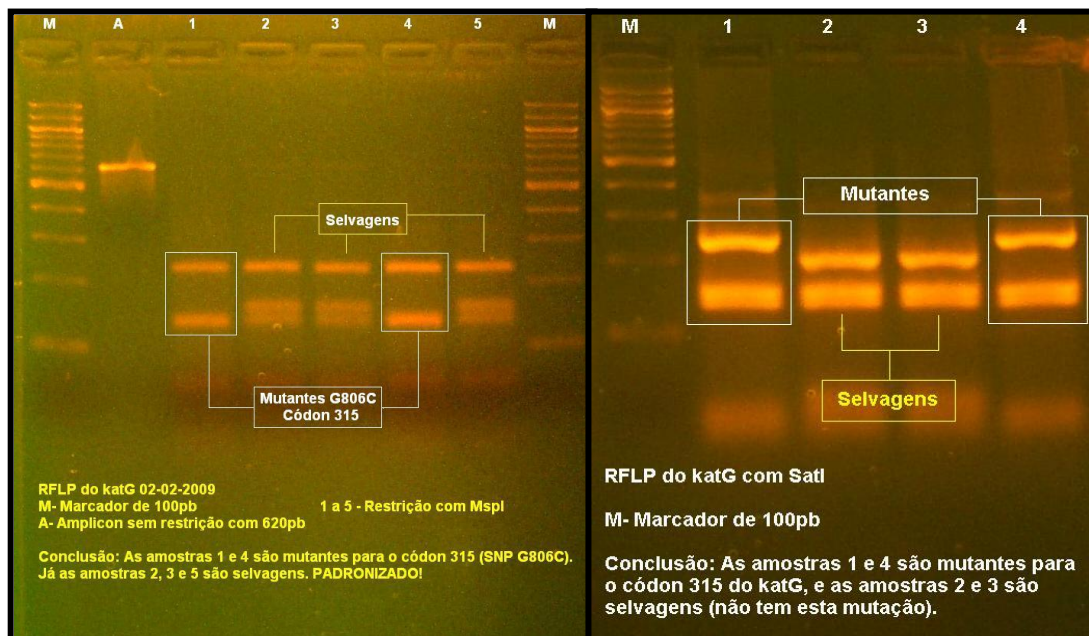


Figura 4. Padrão de restrição das amostras mutantes e selvagens para o códon 315 do gene *katG* através da técnica de RFLP. Comparativo da utilização das enzimas *MspI* (foto à esquerda) e *SatI* (à direita). Nas duas reações foram utilizadas as mesmas amostras numeradas, sendo o resultado igual para as amostras 1 e 4 mutantes, e as amostras 2 e 3 selvagens. Siglas: M (Marcador de 100pb); A (Amplificado – PCR).

Em outro trabalho realizado na Espanha, os resultados foram divergentes quando comparados com os do atual, pois a enzima MspI apontou uma frequência mutacional de 43,8%, enquanto que 49,5% (5,7% a mais) das cepas mutantes foram identificadas utilizando a enzima SatI, sendo esta última mais eficaz para aquele grupo amostral (HERRERA-LÉON *et al.*, 2005).

Em trabalho realizado no Kuwait, Dubai e Beirut, pesquisaram essa mutação utilizando outra enzima além da MspI, a MspAII. Foi encontrada uma frequência de 60% para a primeira, e 65% para a segunda. De acordo com os autores, a enzima MspAII se mostrou mais eficiente na identificação de mutações quando comparada com a primeira, e que a mesma é capaz de identificar todas as alterações observadas na região AGC (com exceção da AGC-CGC), incluído aquelas apontadas pela MspI (AHMAD e MOKADDAS, 2004).

De todas as análises realizadas com as amostras que apresentaram resistência a INH, 53,8% (28) se mostraram selvagens, enquanto que os 46,2% (24) restantes apresentaram mutação no códon 315 do gene *katG*. Além disso, todas as cepas que foram sensíveis a INH não continham mutação nesse códon (Figura 05).

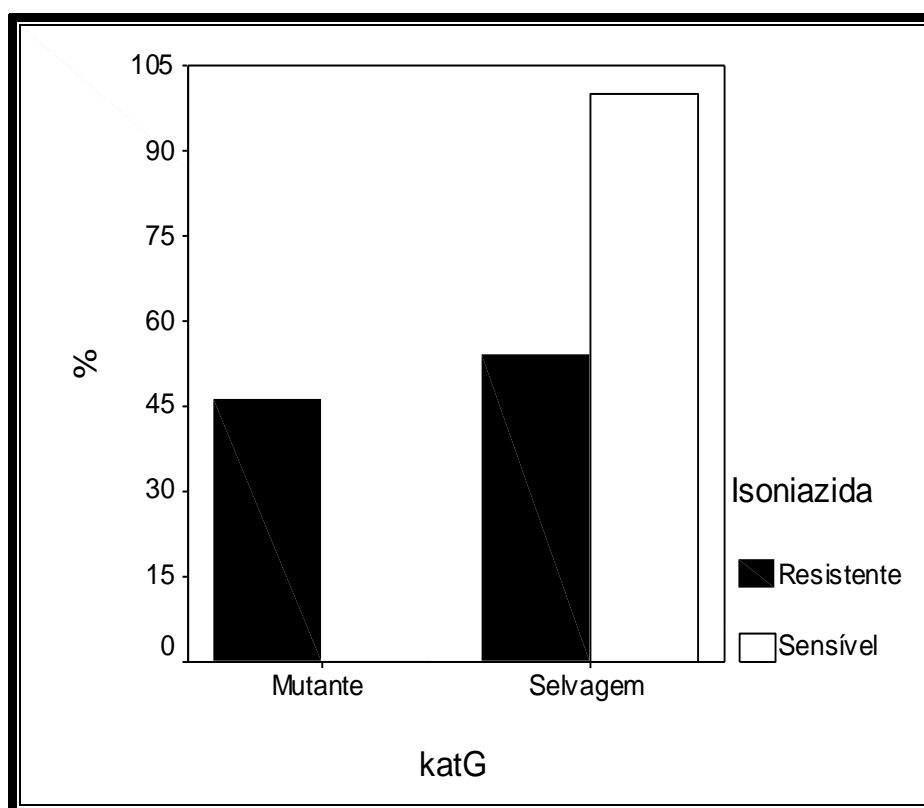


Figura 05 - Frequência de mutação no códon 315 do gene *katG* e sua relação com a produção de cepas resistentes a INH.

A análise comparativa entre o grupo das cepas resistentes/mutantes com aquelas sensíveis/mutantes foi realizada para observar se existia diferença significativa entre os dois grupos, sendo utilizado o teste de Qui-Quadrado (χ^2). Os resultados mostram haver diferença significativa entre esses dois grupos quando analisados, obtendo um $p < 0,01$. Estes dados indicam existir uma relação direta entre o aparecimento da mutação no gene *katG* e o surgimento de cepas INHR, podendo assim afirmar, que esse gene funciona como um bom marcador para a identificação de cepas resistentes aos fármacos.

Analisando diversos artigos publicados, percebe-se que a frequência de mutação identificada pelo atual trabalho está entre aquelas que apresentam menor percentual em todo o mundo.

Na figura 06 observa-se a clara diferenciação entre as amostras mutantes e selvagens diagnosticadas através do método de RFLP. Pode-se observar que nas cepas selvagens (sem a mutação na região promotora C-15T), quando digeridas pela enzima BsmAI, geram dois fragmentos de DNA com os seguintes tamanhos: 165 e 81pb. Entretanto, as cepas portadoras da mutação citada (mutantes) apresentam apenas um fragmento de 246pb, a enzima não digeriu a molécula de DNA, pois houve alteração neste sítio de restrição.

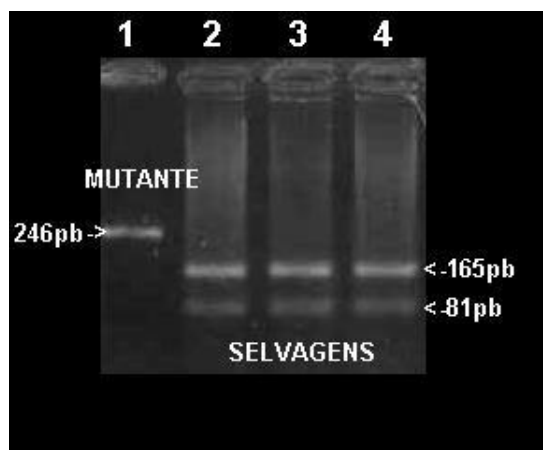


Figura 06. Padrão de restrição das amostras mutantes e selvagens para a região promotora do gene *inhA* através da técnica de RFLP.

Na Figura 07 é possível visualizar os cromatogramas do sequenciamento dos fragmentos de DNA dos genes *katG*, *rpoB* e *inhA*, distinguindo-se os selvagens dos mutantes.

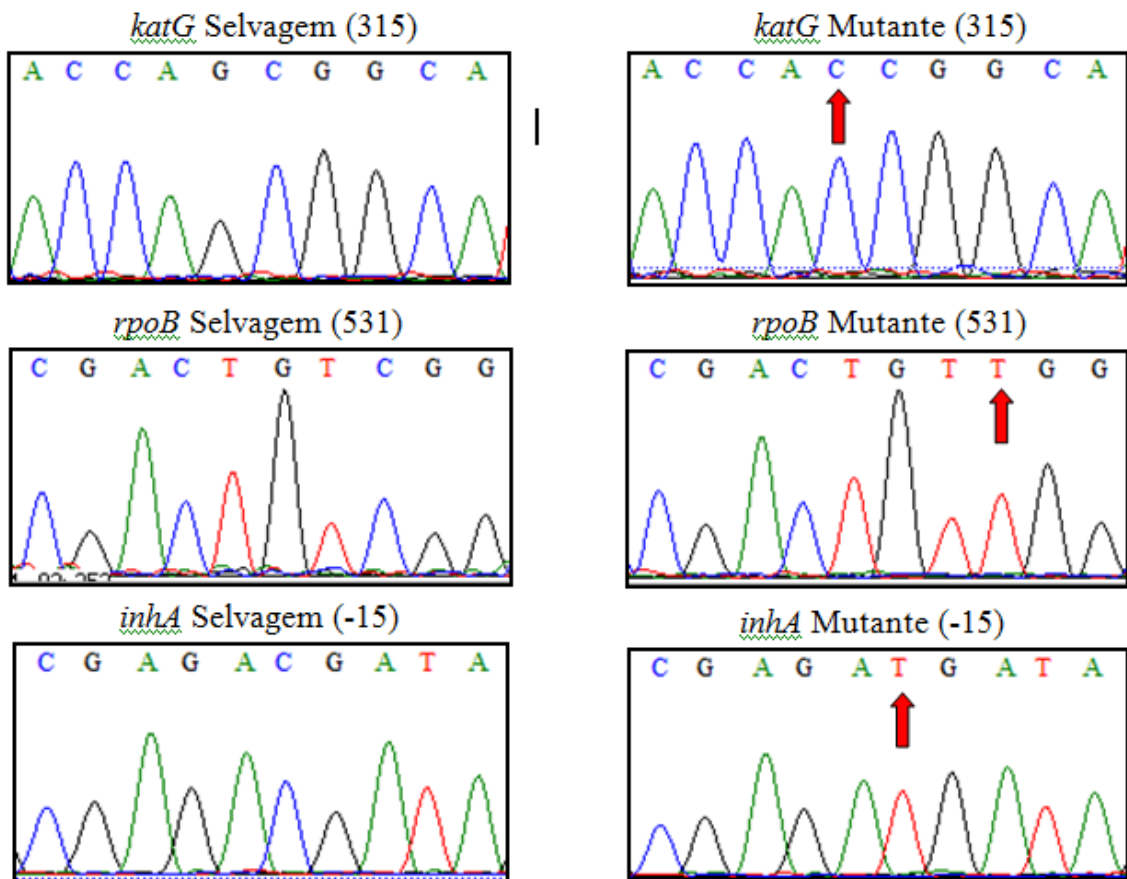


Figura 07. Padrão de cromatogramas do sequenciamento das amostras mutantes e selvagens para os códons 315 do *katG*, 531 do *rpoB* e posição -15 da região promotora do gene *inhA*.

5.3 Análises da mutação em *katG* associado a produção de resistência a INH e aos outros quimioterápicos utilizados no tratamento da TB

Observando os resultados encontrados, conclui-se que todas as cepas mutantes para o gene *katG* obrigatoriamente produzirão resistência a INH. Isso se justifica pela alteração tridimensional da proteína *katG*, responsável pela produção da catalase-peroxidase - enzima responsável pela ativação desse fármaco.

Avaliando a relação entre mutação em *katG* e o surgimento de resistência a outros quimioterápicos, sugere-se também haver dependência entre esses dois eventos. Analisando em ordem de grandeza esses achados, percebe-se que a probabilidade de se ter mutação no gene *katG* e de se produzir uma cepa resistente a RMP é 14 vezes maior, quando comparada a produção de cepas mutantes/sensíveis; de 6,6 vezes para a produção de resistência a EMB; e 2,7 vezes, para a ST.

É importante ressaltar, que os mesmos questionamentos e avaliações mostrados anteriormente também foram testados para a ETH e PZA, mas ambas mostraram que tanto para o teste de χ^2 (com p-valor > 0,05) como para OR (apresentando a variável 1), não existia diferença significativa entre os grupos resistente/mutante e sensível/mutante, indicando então não haver relação entre o surgimento do fenótipo de resistência associado à mutação do gene *katG*. Contudo, em outro trabalho onde foram analisadas 41 cepas resistentes à ETH coletadas em diferentes países (21 dos USA, 6 da Rússia e 6 do Brasil), observou-se haver relação direta entre a mutação do códon 315 com o aparecimento da resistência à aquele fármaco, onde 37% (15) dos microrganismos analisados classificaram-se como resistentes/mutantes (ABBADI *et al.*, 2008). Vale relatar, que os autores não apresentam nenhuma explicação plausível para justificar esse achado.

5.4 Interação entre *katG*, *rpoB* e *inhA* com INH, RMP, EMB e ST, e a nova conduta de tratamento para TB

A identificação de mutações no códon 315 do gene *katG* e no 531 do *rpoB* se mostraram bons marcadores para a identificação não apenas de cepas resistentes a INH e RMP, como também a EMB e ST. Isso possivelmente ocorre por conta da relação de dependência entre os fármacos e da seleção natural de cepas resistentes. Assim, quanto maior for o percentual de cepas multirresistentes, maior a função dos genes *katG* e *rpoB* como marcadores para tais quimioterápicos. Essa correlação pode ser explicada observando-se os esquemas de tratamento preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil.

No ano de 2010, o Ministério da Saúde sugeriu alterações no Esquema I da terapêutica para a TB. A nota técnica objetivou divulgar modificações no sistema de tratamento para a tuberculose a ser implementado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT)/Ministério da Saúde. Essas mudanças aplicar-se-ão aos indivíduos com 10 anos ou mais (BRASIL, 2010).

A primeira mudança consiste na introdução do EMB como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do esquema básico, e tem como justificativa a constatação do aumento da resistência primária à INH (de 4,4 para 6,0%) e a resistência primária à INH associada à RMP (de 1,1 para 1,4%), observado no II Inquérito Nacional de resistência aos fármacos anti-TB conduzido em 2007-2008, em comparação com os resultados do I Inquérito Nacional, realizado no período de 1995 a 1997 (BRASIL, 2009).

No esquema anterior, o EMB era utilizado apenas em pacientes recidivantes ou que não respondessem a primeira linha de tratamentos, mas mesmo assim, os resultados obtidos demonstraram existir uma alta relação daquele quimioterápico com a INH.

Com a utilização do EMB no Esquema I, espera-se no futuro um aumento ainda maior da relação entre esse fármaco e a INH, devido a seleção de cepas que apresentem resistência a ambos os fármacos.

Analisando os grupos resistentes/mutantes e sensíveis/mutantes do gene *inhA* com o teste do χ^2 , o valor de P foi menor que 0.0001, sugerindo diferença significativa entre os mesmos, e portanto, que a mutação C-15T na região promotora do gene *inhA* é indicativo de sensibilidade ou resistência para a INH. Além disso, a frequência nula de cepas sensíveis com a mutação e a frequência máxima de cepas sensíveis sem a mutação nesse mesmo gene fortalece a hipótese descrita pelo autor Silva *et al* (2003), de que essa mutação é um fator determinante para a geração de resistência.

Através da realização de testes estatísticos, como o Odds Ratio e o χ^2 foi possível perceber que há associação significativa entre a ocorrência de mutações no gene *inhA* e a resistência aos antibióticos Isoniazida, Rifampicina e Estreptomicina (Tabela 12). Portanto, o risco relativo de uma cepa de *M. tuberculosis* portadora da mutação C-15T no gene *inhA* ser resistente a Rifampicina é 20 vezes maior do que ser sensível, e para Estreptomicina é cerca de 8 vezes maior de ser resistente do que sensível.

A frequência obtida de isolados mutantes e selvagens para os genes em análise foram cruzadas com os dados de resistência e sensibilidade resultantes do antibiograma. Após ter sido realizado o teste T, o valor de P <0.0001 sugere que há significativa diferença entre o grupo de cepas resistentes com e sem mutação no gene *katG* para o códon polimórfico 315. Além disso, a frequência nula de cepas sensíveis com a mutação e a frequência máxima de cepas sensíveis sem a mutação nesse mesmo gene fortalece a hipótese descrita por diversos autores, como Ramaswamy (2003) e Mokrousov (2002), que afirmam que essa mutação é um fator determinante para a geração de resistência. Entretanto, a população estudada tem uma frequência inferior desta mutação (46.15%) quando comparado a outros estudos já realizados, que apontam na maioria entre 60 e 90%.

Tabela 12. Frequência de *katG* mutantes e selvagens para o códon 315 dentre 52 isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH determinados pelo ensaio de PCR-RFLP.

Padrão de Resistência	Padrão de Mutação	Nº de isolados / Total de números testados (%)
INH*	Selvagem	7/52 (13.46)
	Mutante	5/7 (71.43)
INH e RMP*	Selvagem	2/7 (28.77)
	Mutante	7/52 (13.46)
INH e ETH	Selvagem	1/7 (14.30)
	Mutante	6/7 (85.71)
INH, RMP e PZA**	Selvagem	1/52 (1.92)
	Mutante	1/1 (100)
INH, RMP e BEM*	Selvagem	0/1 (0)
	Mutante	22/52 (42.31)
INH, RMP e ETH*	Selvagem	11/22 (50)
	Mutante	11/22 (50)
INH, RMP e ST*	Selvagem	2/52 (3.85)
	Mutante	1/2 (50)
INH, RMP, PZA e ST	Selvagem	1/2 (50)
	Mutante	4/52 (7.69)
INH, RMP, EMB e ETH*	Selvagem	4/4 (100)
	Mutante	0/4 (0)
INH, RMP, EMB e ST*	Selvagem	1/52 (1.92)
	Mutante	1/1 (100)
INH, RMP, EMB e ST*	Selvagem	0/1(0)
	Mutante	4/52 (7.69)
INH, RMP, EMB e ST*	Selvagem	1/2 (50)
	Mutante	1/2 (50)
INH, RMP, EMB e ST*	Selvagem	4/52 (7.69)
	Mutante	4/4 (100)
INH, RMP, EMB e ST*	Selvagem	4/4 (100)
	Mutante	0/4 (0)

* P < 0.001 para teste T entre Selvagem e Mutante
 ** Esquema I do tratamento da tuberculose (RIP – Rifampicina, Isoniazida e Pirazinamida)

Após os resultados significantes das análises de associação entre mutação e resistência, realizou-se uma observação da distribuição de mutações no códon 315 do gene *katG* associados à resistência por número de fármacos. Estratificou-se quatro grupos para análise da frequência de cepas mutantes e selvagens, que fossem: A) Somente resistentes à isoniazida (monoINH^R), B) Resistentes à isoniazida e qualquer um fármaco do esquema de tratamento da tuberculose (INH^R + 1 Fármaco), C) Resistentes à isoniazida e dois fármacos (INH^R + 2 Fármacos), e D) Resistentes à isoniazida e três ou mais fármacos (INH^R + ≥3 Fármacos).

Estes dados foram organizados na forma de um gráfico (Gráfico 03) e após teste T não paramétrico em cada grupo de resistência com e sem mutação, observou-se que havia diferença significativa dentro dos grupos MonoINH^R e INH^R +1 Fármaco, sugerindo que a presença da mutação no gene *katG* pode ser um fator determinante para a resistência quando administrado somente a INH, entretanto, o grupo de cepas resistentes além da INH a outro fármaco qualquer dos esquemas de tratamento associados, a quantidade de mutantes é superior a de selvagens, sugerindo que as mutações aqui analisadas estejam correlacionadas com a resistência microbiana, e não somente à INH.

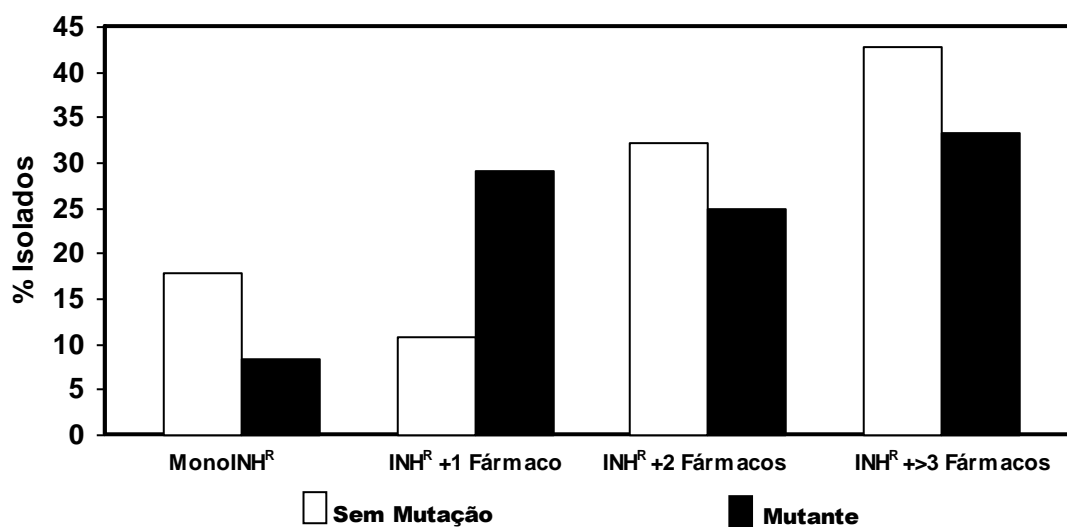


Gráfico 02 Distribuição de mutações no gene *katG* (códon 315) associadas a isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a Isoniazida (INH). Proporção de isolados de *M. tuberculosis* com e sem mutações associadas à resistência a INH foi mostrado de acordo ao padrão de sensibilidade.

As frequências de isolados resistentes a isoniazida e/ou outros fármacos foram classificadas de acordo o padrão de mutação para o códon 315 do gene *katG*, e estão dispostas a seguir na tabela 11. Portanto, houve diferença significativa entre mutantes e selvagens em alguns dos grupos ($P < 0.001$). Sugerindo que esta mutação pode contribuir principalmente para a resistência à INH e associada à rifampicina e outro fármaco, como foi descrito anteriormente por Bakonyte (2003).

Analisando ainda a tabela 3, observa-se que a frequência de cepas resistentes somente a isoniazida é significativamente alta quando comparado às cepas resistentes ao esquema I do tratamento da tuberculose, em que se associam três drogas (Rifampicina, Isoniazida e Pirazinamida). Portanto, estes dados fortalecem a hipótese de que é eficaz associar antibióticos para o tratamento da doença pela infecção do *M. tuberculosis*, visando diminuir o

número de cepas resistentes e aumentar o potencial de eliminação destes microrganismos. Observa-se ainda que a frequência de cepas multirresistentes na população de estudo, ou seja, resistentes a quatro ou mais fármacos é significativamente alta, sendo em torno de 15%.

5.5 Análise das amostras de escarro e de lâminas de esfregaço

Foram analisadas todas as amostras de escarro coletadas, conseguindo-se extrair o DNA total, amplificar e restringir enzimaticamente através do método de PCR-RFLP. Portanto, o diagnóstico molecular rápido de resistência, proposto neste trabalho, foi validado, reduzindo o tempo de entrega do resultado de 60-90 dias para 72 horas. Foi possível também validar as amostras de DNA advindas de esfregaço de escarro em lâmina de microscopia já coradas, fornecendo o resultado de existência de mutação nos genes avaliados.

5.6 Fluxo do Diagnóstico Molecular

Com os resultados e análises auferidos nesse trabalho, foi proposto um modelo de diagnóstico molecular rápido através do fluxo apresentado na figura 08. A combinação da análise molecular dos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* alcançou 95,2% de sensibilidade de diagnóstico, conforme demonstrado na figura 08.

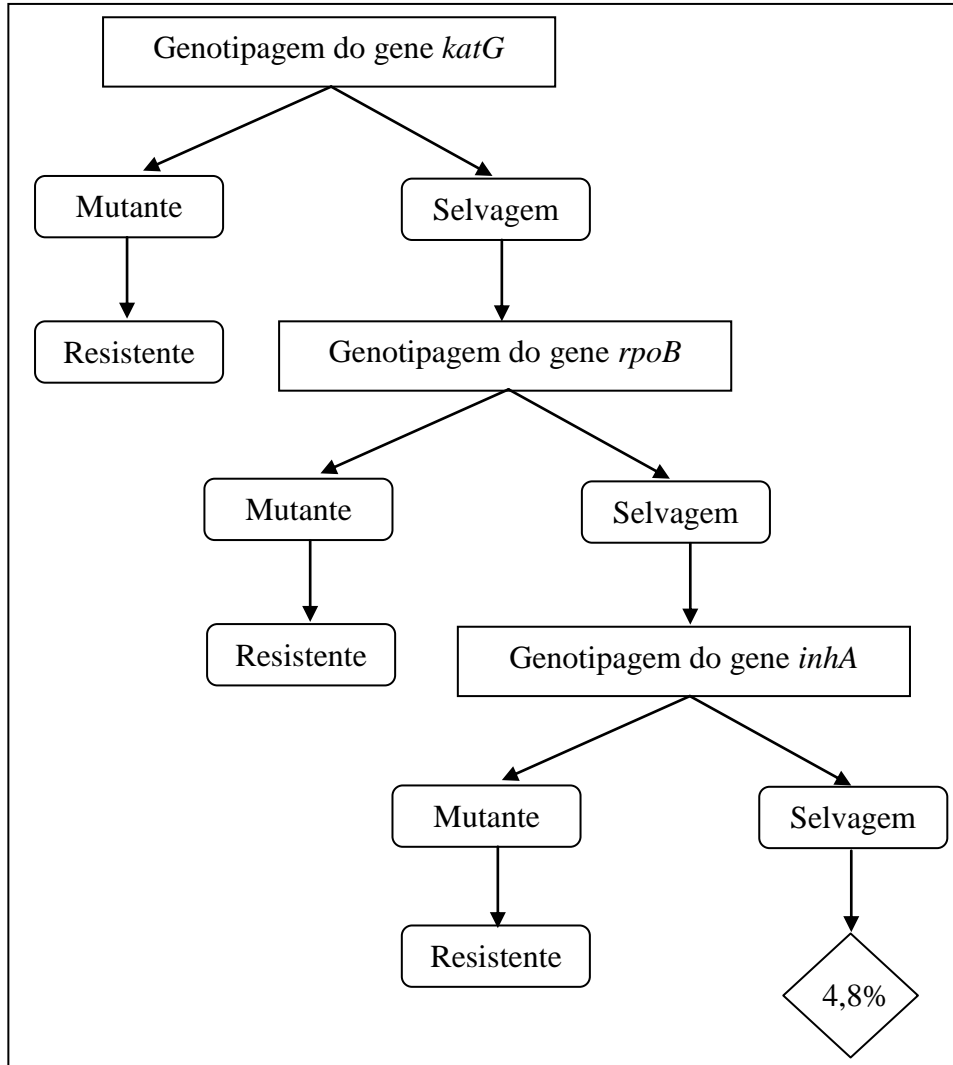


Figura 08. Fluxo de diagnóstico molecular da resistência aos fármacos do tratamento da tuberculose.

Após testes estatísticos foi definido que a análise deve iniciar pelo gene *katG*. Esse modelo de teste molecular rápido propõe que o paciente com resistência à INH, que ao apresentar suspeita clínica e submeter sua amostra de escarro ou de esfregaço em lâmina de microscopia à análise, terá 95,2% de chance em ser diagnosticado, e 100% dos pacientes que não tiverem resistência serão confirmados. Facilitando assim, a entrega do resultado em tempo hábil do médico responsável pelo caso promover uma mudança na conduta medicamentosa, administrando-se fármacos mais adequados para a cura da doença e diminuindo os gastos públicos com quimioterapias inadequadas em pacientes não responsivos.

6 - Conclusão

1. As mutações nos códon 315 do gene *katG*, 531 do gene *rpoB* e na região promotora do gene *inhA* servem como bons marcadores para detectar resistência aos fármacos do tratamento da tuberculose em isolados clínicos de *M. tuberculosis*.
2. A técnica de PCR-RFLP, validada pelo sequenciamento, que foi descrita nessa pesquisa é rápida, de fácil execução, de fácil interpretação e tão eficiente quanto à cultura, mesmo utilizando amostras de escarro e/ou lâmina.
3. Esta detecção genética de resistência facilitará a entrega do resultado a tempo de administrar os fármacos mais adequados para a cura da doença, diminuindo os gastos com a quimioterapia inadequada em pacientes não responsivos ao tratamento.
4. O fluxo proposto é inovador e eficaz para diagnosticar cepas resistentes ou multirresistentes aos fármacos do tratamento da tuberculose.

7 – Referências Bibliográficas

ABBADI, S. H.; SAMEAA, G. A.; MORLOCK, G. *et al.* Molecular Identification of Mutations Associated with Anti-Tuberculosis Drug Resistance Among Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Infectious Diseases**. 10:1-6, 2008.

BENTO, João *et al.* **Métodos Diagnósticos em Tuberculose**, Acta Médica Portuguesa, V. 24, págs.145-154, 2011.

BRASIL. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias**. Departamento de vigilância epidemiológica, Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias**. Departamento de vigilância epidemiológica, Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRENNAN, P. J.; NIKAIIDO, H. *The envelope of Mycobacteria*. **Ann. Rev. Biochem.**, 64:29-63, 1995.

BRAGA, J. U; BARRETO, A. M. W.; HIJJAR, M. A. Inquerito epidemiológico da resistência as drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995 – 1997, IERDTB. Parte III: principais resultados. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, 11(1):76-81, 2003.

BRAGA, U. José *et al.* **Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose nos serviços de atenção básica em dois municípios brasileiros, Manaus e Fortaleza, 2006 a 2008**, Caderno de Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, V. 20, Nº 02, Págs 225-33, 2012.

COMISSÃO DE TUBERCULOSE DA SBPT; GRUPO DE TRABALHO DAS DIRETRIZES PARA TUBERCULOSE DA SBPT. **III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, Jornal Brasileiro de Pneumologia; V. 35, Nº 10, Págs.1018-1048, 2009.

DAVID, H. L. Drug-Resistance in *M. tuberculosis* and Other Mycobacteria. **Clin Chest Med**; 1(2):227-30, 1980.

DEL PORTILLO, P., L. A. MURILLO, M. E. PATARROYO. Amplification of species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. **J. Clin. Microbiol.** 29:2163-2168, 1991.

DUARTE, Raquel *et al.* **Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação**, Revista Portuguesa de Pneumologia, V. XVI, Nº 04, Julho/Agosto, 2010.

GOODMAN, Louis; GILMAN, Alfred. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Editora McGraw-Hill, 11ª ed, 2006.

HAZBON, M. H.; BRIMACOMBE, M; BOBADILLA DEL VALLE, M. *et al.* Population genetics study of isoniazid resistance mutational spoligotyping database (SploDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiol**, 6:23, 2006.

KREMER, L., DOVER, L. G.; CARRERE, S.; *et al.* Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the β -ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochem. Journal**, 364:423-430, 2002.

KREMER, L.; DOUGLAS, J. D.; BAULARD, A. R.; *et al.* Thiolactamycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Biol. Chem.**, 275:16857-16864, 2000.

KRITSKI, A. L.; CONDE, B. C.; SOUZA, G. R. M. **Tuberculose: Do Ambulatório à Enfermaria**. 3 edicao, Ed. Atheneu, 259p, 2000.

LAVOR, P. Edilene. **Estudo de Pré-Formulação para dose fixa combinada dos tuberculostáticos – Rifampicina, isoniazida pirazinamida e Etambutol (4 em 1)**. 2010. 122 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2010.

MARTTILA, H. J.; SOINI, H. Molecular Detection of Resistance to Antituberculous Therapy. **Clin Lab Med**, 23:823-41, 2003.

MOKROUSOV, I.; NARVSKAYA, O.; OTTEN, T. *et al.* High Prevalence of katG Ser315Thr Substitution Among Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 46(05):1417-1424, 2002

NICOLETTI, Natália Fontana. **Efeito Protetor do Resveratrol na Hepatotxicidade Induzida por Fármacos Anti- Tuberculose Isoniazida e Rifampicina em Camundongos**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

NIKAIDO, H. Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. **Science**, 264:382-8, 1994.

PALOMINO, J. C.; LEAO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**, 686p. Livro retirado do site: www.TuberculosisTextbook.com. Acesso em Marco de 2013.

POST, F. A.; WILLCOX, P. A.; MATHEMA, B. *et al* Genetic Polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients with Chronic Multidrug-Resistant Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**. 190:99-106, 2004.

PRETORIUS, G. S.; VAN HELDEN, P. D.; SIRGEL, F. *et al* Mutations in katG Gene Sequences in Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Are Rare. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 39(10):2276-2281, 1995.

RAMASWAMY, S.; MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. **Tubercle and Lung Disease**,79(1):3-29, 1998.

ROSSETTI, M. L. R.; JARDIM, S. B.; RODRIGUES, V. F. S *et al.* Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* Detection in Clinical Samples Using DNA Purified by Glassmatrix. **Journal of Microbiological Methods**, 28: 139-146, 1997.

SILVA, M. S. N, SENNA, S. G., RIBEIRO, M. O *et al.* Mutation in katG, inhA, and ahpC Genes of Brazilian Isoniazid-Resistant of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(9):4471-4, 2003.

SIQUEIRA, H. R.; FREITAS, F. A. D.; OLIVEIRA, D. N. *et al.* Resistencia do *Mycobacterium tuberculosis* a Isoniazida por Mutacoes em Duas Regioes Diferentes do Gene katG. **J. Bras. Pneumol.** 35(08):773-779, 2009.

SKONIKOVA, O. I.; NOSOVA, E. Y.; MARKOVA, O. V. *et al.* Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Resistant to Rifampicin and Isoniazid by Molecular Biological Methods. **Immunology and Microbiology.** 3:273-5, 2003.

TELENTI, A. Genetic of Drug Resistance in Tuberculosis. **Clinics in Chest Medicine**,18(01): 55-64, 2007.

TIRUVILUAMALA, P.; REICHMAN, L. B. Tuberculosis. **Annu. Rev. Public Health**, 23:403 a 426, 2002.

VILCHEZE, C.; JACOBS JR., W. R. The mechanism of Isoniazida killing: Clarity through the scope of genetics. **Annu. Rev. Microbiol.**, 61: 35-50, 2007.

YEN W. Wing; LENG. C. Chi. **Antituberculosis drugs and hepatotoxicity**, *Revist Respiriology*, N° 11, p. 699 – 707, 2006.