



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Aplicação de sistemas moleculares
na detecção rápida de MDR-TB e XDR-TB

Samuel Nuno Furtado da Conceição Francisco

2011



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



Aplicação de sistemas moleculares
na detecção rápida de MDR-TB e XDR-TB

Samuel Nuno Furtado da Conceição Francisco

Tese apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional

Orientadora:

Prof^a Doutora Isabel Couto

2011

Agradecimentos

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, que tornaram a sua realização possível e me proporcionaram a oportunidade de trabalhar nos seus laboratórios. Desejo salientar:

A Professora Doutora Isabel Couto, minha orientadora de mestrado, com quem muito aprendi ao longo deste tempo, pela partilha da sua experiência, conhecimentos, saberes e sugestões, por ter acreditado em mim, pela sua paciência, disponibilidade, ajuda e empenho e pelo seu incentivo permanente no decorrer deste trabalho. Gostaria ainda de lhe agradecer a revisão criteriosa desta Dissertação.

O Professor Doutor Miguel Viveiros, Director da Unidade de Ensino e Investigação em Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por ter acreditado em mim, por me ter proporcionado a oportunidade de trabalhar no laboratório de Micobactérias e pelo conjunto de conhecimentos, saberes e conselhos que me transmitiu. Gostaria ainda de lhe agradecer a revisão crítica desta Dissertação.

A todos os elementos da unidade de Micobactérias, Professor Doutor Leonard Amaral, Diana, Sofia, Jorge, Marta, Liliana, Susana, Gabriella, Pedro, Miguel, Antónia, Cláudia e Lisa pelos conhecimentos que me transmitiram, pela constante disponibilidade, apoio e excelente espírito de equipa. Em particular, gostaria de agradecer à Mestre Diana Machado, pela partilha das suas experiências e conhecimentos, pelo tempo passado no laboratório na minha formação e por ter contribuído directamente para este estudo, com diversos resultados fenotípicos e moleculares, ao Mestre Jorge Ramos por alguns dos resultados fenotípicos incluídos neste trabalho e pelo tempo passado no laboratório na minha formação e à Doutora Liliana Rodrigues, pela ajuda na realização do ensaio de sequenciação.

À D. Fernanda e à D. Teresa, pela prontidão e por todo o apoio prestado.

A todos os meus colegas de mestrado pelo companheirismo demonstrado.

À Fundação Calouste Gulbenkian (Serviço de Saúde e Desenvolvimento Humano), pelo apoio financeiro prestado no âmbito do projecto “Diagnóstico e Epidemiologia Molecular de M/XDR-TB na Grande Lisboa: a Detecção Precoce na Prevenção da Emergência e Disseminação de Estirpes de *M. tuberculosis* Extensivamente Resistentes”, referência SDH49;

A minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã o meu particular obrigada, pelo imenso carinho e compreensão que sempre demonstraram.

A uma pessoa muito especial, por todo o apoio, paciência, carinho e afecto demonstrando ao longo destes últimos meses.

Estou em dívida para com todas estas pessoas pela sua ajuda, apoio e paciência. E é por isso que quero dedicar esta Dissertação a todos aqueles que, sem reservas, partilharam comigo os seus conhecimentos. **Muito Obrigado a Todos!**

Índice

Agradecimentos.....	i
Índice.....	iii
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
1 Introdução.....	1
1.1 Género <i>Mycobacterium</i>	1
1.1.1 Taxonomia.....	1
1.1.2 Morfologia e Estrutura.....	1
1.1.3 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1.2 Terapêutica.....	3
1.3 MDR-TB e XDR-TB.....	4
1.3.1 MDR-TB.....	4
1.3.2 XDR-TB.....	4
1.4 Epidemiologia.....	5
1.5 Resistências aos Antibióticos.....	6
1.5.1 Isoniazida.....	7

1.5.2 Rifampicina	13
1.5.3 Etambutol	16
1.5.4 Fluoroquinolonas.....	18
1.5.5 Aminoglicosídeos e Péptidos Cíclicos	20
1.6 Diagnóstico.....	21
2 Objectivos.....	23
3 Material e Métodos.....	24
3.1 Material	24
3.1.1 Estirpe de Referência.....	24
3.1.2 Isolados Clínicos	24
3.1.3 Amostras Clínicas.....	26
3.1.4 Outro Material Biológico	28
3.1.5 Soluções e Enzimas	28
3.2 Métodos	30
3.2.1 Algoritmo usado na pesquisa de <i>M. tuberculosis</i> por métodos moleculares em amostras respiratórias com baciloscopia positiva	30
3.2.2 Extracção de DNA Genómico	32
3.2.3 INNO-LiPA Rif. TB.....	32
3.2.4 GenoType MTBDRplus	37
3.2.5 GenoType MTBDRsl	41
3.2.6 Sequenciação do gene <i>rpoB</i>	46
3.2.7 Validação analítica dos sistemas de detecção molecular estudados.....	47

4 Resultados	50
4.1 Detecção de Tuberculose Multirresistente (MDR-TB)	50
4.1.1 Isolados Clínicos	50
4.1.2 Amostras Clínicas.....	57
4.2 Detecção de Tuberculose Extensivamente Resistente (XDR-TB).....	67
4.2.1 GenoType MTBDRsl	67
5 Discussão.....	72
5.1 Detecção de Tuberculose Multirresistente (MDR-TB)	72
5.1.1 Isolados clínicos	73
5.1.2 Amostras clínicas	82
5.2 Detecção de Tuberculose Extensivamente Resistente (XDR-TB).....	96
5.2.1 MTBDRsl	96
6 Conclusões.....	102
Referências Bibliográficas	107

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismo proposto para a acção da isoniazida em <i>M. tuberculosis</i>	9
Figura 2. Representação esquemática das mutações identificadas no <i>locus inhA</i> em isolados de <i>M. tuberculosis</i> resistentes à isoniazida	13
Figura 3. Mutações localizadas na região de determinação de resistência à rifampicina (RRDR de “rifampicin resistance determining region”) do gene <i>rpoB</i> de <i>M. tuberculosis</i>	15
Figura 4. Principais mutações observadas no gene <i>gyrA</i> de isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes as fluoroquinolonas	19
Figura 5. Algoritmo de trabalho do laboratório de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina, usado na pesquisa de <i>M. tuberculosis</i> por métodos moleculares em amostras respiratórias com baciloscopia positiva	31
Figura 6. Representação esquemática do gene <i>rpoB</i> e das posições dos “primers” e das sondas do INNO-LiPA Rif. TB	33
Figura 7. Ilustração da posição das diferentes sondas oligonucleotídicas na tira de nitrocelulose do sistema de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB.....	34
Figura 8. Ilustração da tira do sistema de detecção molecular GenoType MTBDRplus.....	38
Figura 9. Representação esquemática da região de determinação de resistência à rifampicina (RRDR de “rifampicin resistance determining region”) no gene <i>rpoB</i> e das posições das sondas do sistema MTBDRplus.....	39
Figura 10. Ilustração da tira do sistema de detecção molecular GenoType MTBDRsl.....	43
Figura 11. Representação esquemática da região de determinação de resistência às fluoroquinolonas (QRDR de “quinolone-resistance determining region”) no gene <i>gyrA</i> e das posições das sondas do sistema MTBDRsl.....	44

Figura 12. Tabela modelo usada para a validação analítica dos sistemas de detecção molecular estudados e respectivas fórmulas para o cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN).....	48
Figura 13. Visualização exemplificativa dos produtos de amplificação por “Nested” PCR do INNO-LiPA Rif. TB, após electroforese em gel de agarose (2%).....	51
Figura 14. Padrões de hibridação obtidos com o sistema de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB para diferentes isolados.....	52
Figura 15. Visualização exemplificativa dos produtos de amplificação por “Multiplex” PCR do MTBDRplus, após electroforese em gel de agarose (2%).....	53
Figura 16. Padrões de hibridação obtidos com o sistema de detecção molecular MTBDRplus para diferentes isolados.....	54
Figura 17. Visualização dos produtos de amplificação do “Nested” PCR do INNO-LiPA Rif. TB para a amostra 7, após electroforese em gel de agarose (2%).....	58
Figura 18. Padrões de hibridação obtidos com o sistema de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB para diferentes amostras.....	59
Figura 19. Visualização dos produtos de amplificação por “Multiplex” PCR do MTBDRplus, após electroforese em gel de agarose (2%), para diferentes amostras.....	60
Figura 20. Padrões de hibridação obtidos com o sistema de detecção molecular MTBDRplus para diferentes amostras.....	62
Figura 21. Alinhamento do resultado de sequenciação da amostra 3 com a estirpe de referência H37Rv.....	66
Figura 22. Visualização exemplificativa dos produtos de amplificação por “Multiplex” PCR do MTBDRsl, após electroforese em gel de agarose (2%).....	67
Figura 23. Padrões de hibridação obtidos com o sistema de detecção molecular MTBDRsl para diferentes isolados.....	69

Índice de Tabelas

Tabela 1. Isolados clínicos estudados.....	25
Tabela 2. Amostras clínicas estudadas.....	27
Tabela 3. Sequência nucleotídica e gene alvo dos “primers” utilizados no trabalho.....	28
Tabela 4. Enzimas utilizadas.....	29
Tabela 5. Composição e modo de preparação de soluções.....	29
Tabela 6. Sonda selvagem e de mutação do sistema MTBDRplus para o gene <i>katG</i> e mutações correspondentes.....	39
Tabela 7. Sondas selvagens e de mutação do sistema MTBDRplus para a região promotora do operão <i>mabA (fabG1) /inhA</i> e mutações correspondentes	40
Tabela 8. Sondas selvagens e de mutação do sistema MTBDRsl para o gene <i>rrs</i> , com as mutações e a resistência fenotípica correspondentes	44
Tabela 9. Sondas selvagens e de mutação do sistema MTBDRsl para o gene <i>embB</i> , com as mutações e a resistência fenotípica correspondentes	45
Tabela 10. Resumo dos resultados dos sistemas de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus na identificação de MDR-TB em isolados clínicos.....	55
Tabela 11. Resumo dos resultados dos sistemas de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus na identificação de MDR-TB em amostras respiratórias com baciloscopia positiva...	63
Tabela 12. Resumo dos resultados do sistema de detecção molecular MTBDRsl na identificação de XDR-TB em isolados clínicos.....	70
Tabela 13. Correlação entre o sistema INNO-LiPA Rif. TB e o método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por sondas AccuProbe, na identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> em isolados clínicos.	74

Tabela 14. Sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema INNO-LiPA Rif. TB na identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> em isolados clínicos.....	74
Tabela 15. Correlação entre o sistema INNO-LiPA Rif. TB e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em isolados clínicos do complexo <i>M. tuberculosis</i>	75
Tabela 16. Sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema INNO-LiPA Rif. TB na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em isolados clínicos do complexo <i>M. tuberculosis</i>	75
Tabela 17. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por sondas AccuProbe, na identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> em isolados clínicos.	78
Tabela 18. Sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema MTBDRplus na identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> em isolados clínicos.....	78
Tabela 19. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em isolados clínicos do complexo <i>M. tuberculosis</i>	79
Tabela 20. Sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema MTBDRplus na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em isolados clínicos do complexo <i>M. tuberculosis</i>	79
Tabela 21. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida em isolados clínicos do complexo <i>M. tuberculosis</i>	80
Tabela 22. Sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema MTBDRplus na detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida em isolados clínicos do complexo <i>M. tuberculosis</i>	81

Tabela 23. Correlação entre o sistema INNO-LiPA Rif. TB e o método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por sondas AccuProbe, na identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.	83
Tabela 24. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do sistema INNO-LiPA Rif. TB na identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.	84
Tabela 25. Correlação entre o sistema INNO-LiPA Rif. TB e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.	85
Tabela 26. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do sistema INNO-LiPA Rif. TB na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.	86
Tabela 27. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por sondas AccuProbe, na identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.	88
Tabela 28. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do sistema MTBDRplus na identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.	89
Tabela 29. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.	90
Tabela 30. Especificidade e valor preditivo negativo do sistema MTBDRplus na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.	91

Tabela 31. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.	92
Tabela 32. Especificidade e valor preditivo negativo do sistema MTBDRplus na detecção de mutações que conferem resistência de resistência à isoniazida em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.	93
Tabela 33. Correlação entre o sistema MTBDRsl e o método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por sondas AccuProbe, na identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> em isolados clínicos.	97
Tabela 34. Valores em percentagem de sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema MTBDRsl na identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> em isolados clínicos.	97
Tabela 35. Correlação do MTBDRsl com o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência ao etambutol em isolados clínicos.	99
Tabela 36. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do MTBDRsl na detecção de mutações que conferem resistência ao etambutol em isolados clínicos do complexo <i>M. tuberculosis</i>	100

Lista de Abreviaturas

ACP - proteína transportadora de grupos acil, de “Acyl Carrier Protein”

A ou Ala - alanina

Arg - arginina

ATCC - “American Type Culture Collection” (Rockville, MD E.U.A.)

BAAR – bacilos álcool-ácido-resistentes

CDC - “Center for Disease Control and Prevention” (Atlanta, E.U.A.)

CMI - concentração mínima inibitória

CoA - coenzima A

D ou Asp - ácido aspártico

DNA - ácido desoxirribonucleico, de “DeoxyriboNucleic Acid”

DOTS - tratamento de curta duração directamente observado, de “Directly Observed Therapy, Short Course”

EMB – etambutol

ERDR - região de determinação de resistência ao etambutol, de “ethambutol resistance determining region”

FASII - sistema de síntese dos ácidos gordos tipo II, de “fatty acid synthase type II system”

G ou Gly - glicina

H ou His - histidina

VIH - vírus da imunodeficiência humana

I ou Ile - isoleucina

INH - isoniazida

InhA - enzima enoil-ACP redutase

KatG - catalase-peroxidase

L ou Leu - leucina

LiPA - ensaio de sondas em banda, de “line probe assay”

M ou Met - metionina

MDR - multirresistente aos antibióticos, de “multidrug-resistant”

MDR-TB - tuberculose multirresistente aos antibióticos, de “multidrug-resistant tuberculosis”

MOTT - outras micobactérias que não *M. tuberculosis*, de “mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*”

mRNA - RNA mensageiro

MTBC - complexo *Mycobacterium tuberculosis*

NAD - nicotinamida adenina dinucleótido na forma oxidada

NADH - nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida

OMS - Organização Mundial da Saúde

P ou Pro - prolina

PCR - reacção da polimerase em cadeia, de “polymerase chain reaction”

PZA - pirazinamida

QRDR - região de determinação de resistência às fluoroquinolonas, de “quinolone-resistance determining region”

RIF - rifampicina

rpm - rotações por minuto

RRDR - região de determinação de resistência à rifampicina, de “rifampicin resistance determining region”

RNA - ácido ribonucleico, de “ribonucleic acid”

rRNA - RNA ribossômico

S ou Ser - serina

Sida - síndrome da imunodeficiência adquirida

SNPs - polimorfismos de nucleotídeo único, de “single nucleotide polymorphisms”

T ou Thr - treonina

tRNA - RNA transferência

V ou Val - valina

XDR - extensivamente resistente aos antibióticos, de “extremely drug-resistant”

XDR-TB - tuberculose extensivamente resistente aos antibióticos, de “extremely drug-resistant tuberculosis”

Y ou Tyr - tirosina

Resumo

Mycobacterium tuberculosis é o agente etiológico da tuberculose em humanos e segundo as estimativas da Organização Mundial da Saúde, um terço da população mundial está infectada com esta bactéria, calculando-se que no ano de 2008 aproximadamente 9,4 milhões de pessoas contraíram tuberculose activa. Associada a esta tendência, encontra-se o aumento alarmante da incidência de tuberculose resistente aos antibióticos, mais propriamente da tuberculose multirresistente e extensivamente resistente.

Nesta Dissertação estudaram-se três sistemas de detecção molecular (INNO-LiPA Rif. TB, Innogenetics, Ghent, Bélgica, MTBDRplus e MTBDRsl, GenoType, GmbH, Nehren, Alemanha), que permitem detectar o complexo *M. tuberculosis* e as mutações mais comuns associadas à resistência aos antibióticos de primeira e segunda linha. Para o efeito, na primeira parte do trabalho os três sistemas em estudo foram testados em 21 isolados clínicos pertencentes à colecção do Laboratório de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, UNL), com o propósito de avaliar a sua capacidade para identificar o complexo *M. tuberculosis* e detectar mutações ligadas à resistência aos fármacos de primeira e segunda linha. Na segunda parte do trabalho, os sistemas INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus foram testados em 33 amostras respiratórias com baciloscopia positiva, com o propósito de aferir a “performance” destes sistemas para a detecção directa de tuberculose multirresistente em amostras respiratórias.

Na primeira parte do trabalho os três sistemas em estudo apresentaram elevada sensibilidade na identificação do complexo *M. tuberculosis* em culturas, bem como na detecção de mutações ligadas à resistência aos antibióticos de primeira linha, com excepção do etambutol. No que diz respeito à detecção da resistência aos antibióticos de segunda linha, não foi possível calcular os valores de sensibilidade e especificidade.

Na segunda parte do trabalho, o INNO-LiPA Rif. TB demonstrou ser o sistema mais robusto para a análise directa de amostras respiratórias com baciloscopia positiva, para um diagnóstico

precoce de tuberculose e detecção de resistência à rifampicina. O MTBDRplus não se mostrou uma alternativa viável ao INNO-LiPA Rif. TB, pois apresentou baixa sensibilidade para a identificação do complexo *M. tuberculosis* e vários problemas no passo de amplificação. O MTBDRsl não foi testado, por não ter sido detectada nenhuma amostra multirresistente.

Abstract

Mycobacterium tuberculosis is the etiologic agent of tuberculosis in humans and, according to the World Health Organization, one-third of the world's population is infected with this bacteria, with an estimated 9.4 million incident cases of tuberculosis globally in 2008. Associated with this alarming trend is a frightening increase in the incidence of *M. tuberculosis* resistant to antibiotics, more specifically multidrug-resistant tuberculosis and extremely drug-resistant tuberculosis.

In this Thesis, we studied three molecular detection systems (INNO-LiPA Rif. TB, Innogenetics, MTBDRplus and MTBDRsl, GenoType), which allow the molecular identification of the *M. tuberculosis* complex and the detection of mutations most often associated with antibiotic resistance. In the first phase of the work the three systems were tested in 21 clinical isolates belonging to the collection of the Mycobacteria Laboratory of IHMT, UNL, with the aim to assess their ability for identifying the *M. tuberculosis* complex and to detect mutations related to the resistance to first and second line antibiotics. In the second stage of the study, the INNO-LiPA Rif. TB and the MTBDRplus were tested in acid-fast positive respiratory specimens, to assess their performance to detect directly *M. tuberculosis* and mutations related to rifampicin resistance in these specimens.

In the first part of the work the three systems showed high sensitivity for the identification of the *M. tuberculosis* complex and for detection of resistance to first line antibiotics, except for ethambutol. Regarding the detection of resistance in second line antibiotics, we could not calculate the sensitivity and specificity.

In the second part of the work the INNO-LiPA Rif. TB assay proved to be the system of choice for use directly in acid-fast positive respiratory specimens in the early diagnosis of tuberculosis and the detection of rifampicin resistance. The MTBDRplus was not a good alternative to the INNO-LiPA Rif. TB due to its low sensitivity in the identification of the *M. tuberculosis* complex and the

occurrence of several problems in the amplification step. The MTBDRsl was not used because no multidrug resistant samples were detected.

1 Introdução

1.1 Género *Mycobacterium*

O género *Mycobacterium* engloba um elevado número de espécies com grande relevância médica, dos quais se destacam *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, e *Mycobacterium ulcerans*, agentes etiológicos da tuberculose, lepra e úlcera de Buruli, respectivamente. Contém também outras espécies, como é o caso das espécies de micobactérias ambientais, designadas como micobactérias atípicas ou outras micobactérias que não *M. tuberculosis* (MOTT de “mycobacteria other than *M. tuberculosis*”), as quais são responsáveis por diversos tipos de micobacterioses (Smith, 2003; Murray *et al.*, 2003; Dworkin, 2006).

1.1.1 Taxonomia

O género *Mycobacterium* é o único membro da família Mycobacteriaceae, ordem Actinomycetales e classe Actinomycetes. Este género partilha com os géneros *Nocardia* e *Corynebacterium*, também da ordem Actinomycetales, um conteúdo elevado de guanina e citosina (conteúdo G+C) no DNA genómico e a produção de ácidos micólicos (Smith, 2003; Murray *et al.*, 2003; Dworkin *et al.*, 2006).

1.1.2 Morfologia e Estrutura

As micobactérias são bacilos finos, levemente curvos ou rectos, que medem 0,2 µm a 0,6 µm por 1,0 µm a 10 µm. São aeróbios (embora algumas espécies e estirpes se possam desenvolver em condições microaerofílicas), imóveis e não formadores de esporos (Murray *et al.*, 2003; Ryan & Ray, 2004; Murray & Pfaller, 2009). Possuem uma parede celular extremamente complexa e muito rica em lípidos, composta por peptidoglicano ligado covalentemente a polissacáridos de

arabinogalactano, que estão esterificados com ácidos micólicos (ácidos gordos de cadeias longa com 70 a 90 carbonos), formando o complexo de ácidos micólicos, peptidoglicano e arabinogalactano (Brennan, 1995; Crick *et al.*, 2001; Brennan, 2003; Alderwick *et al.*, 2007; Ullrich, 2009). A parede celular das micobactérias é responsável por muitas das propriedades destas bactérias, das quais se destacam a resistência aos detergentes, resistências a grande parte dos antibióticos, antigenicidade e a resistência aos ácidos (Ryan & Ray, 2004; Murray & Pfaller, 2009).

A morfologia das colónias varia para as diferentes espécies de micobactérias, desde formas lisas a rugosas, com ou sem pigmentação. O tempo de crescimento é também variável, existindo espécies de crescimento lento (com formação de colónias em meio sólido a partir do sétimo dia de incubação) e espécies de crescimento rápido (com formação de colónias em meio sólido em menos de sete dias de incubação). É ainda importante realçar que as chamadas micobactérias de crescimento rápido, apresentam mesmo assim uma taxa de crescimento mais lento que a maioria das outras bactérias (Murray *et al.*, 2003; Ryan & Ray, 2004; Murray & Pfaller, 2009).

1.1.3 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) inclui várias espécies intimamente relacionadas e responsáveis pela tuberculose humana e zoonótica, sendo elas, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, “*Mycobacterium canetti*”, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium pinnipedii*. O membro mais conhecido do MTBC é *M. tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose em humanos e principal causador de tuberculose a nível mundial. Esta bactéria infecta principalmente os pulmões, podendo contudo causar infecção, potencialmente fatal se não for tratada apropriadamente, em qualquer parte do corpo humano, incluindo os rins e o cérebro (Donald *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2003; Coros *et al.*, 2005; Djelouadji *et al.*, 2008; Wirth *et al.*, 2008). Segundo as estimativas da Organização

Mundial da Saúde (OMS), um terço da população mundial está infectada com *M. tuberculosis* (World Health Organization, 2010b).

1.2 Terapêutica

Os fármacos utilizados no tratamento da tuberculose são tradicionalmente divididos em dois grupos, o dos fármacos de primeira linha e o dos fármacos de segunda linha. Os fármacos de primeira linha usados no tratamento da tuberculose são a isoniazida (INH), a rifampicina (RIF), o etambutol (EMB), a estreptomicina (STR) e a pirazinamida (PZA). Os fármacos de segunda linha englobam as fluoroquinolonas (levofloxacina, ofloxacina, moxifloxacina, entre outras), os aminoglicosídeos (canamicina e amicacina), os péptidos cíclicos (viomicina e capreomicina), o ácido para-aminosalicílico, a cicloserina, a etionamida e a protionamida (World Health Organization, 2008d; World Health Organization, 2009b).

A terapêutica actualmente utilizada no tratamento da tuberculose evoluiu através de numerosos estudos experimentais e clínicos, conduzidos entre 1950 a 1970 (Fox *et al.*, 1999). O regime padrão de tratamento presentemente recomendado para novos doentes com tuberculose pulmonar activa sem resistência aos fármacos tem uma duração mínima de seis meses, sendo dividido numa fase inicial de dois meses no qual o doente é tratado com quatro antibióticos, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, seguido por uma fase de quatro meses de tratamento com isoniazida e rifampicina (World Health Organization, 2008d; World Health Organization, 2009b; Spigelman, 2007; American Thoracic Society, CDC, and Infectious Diseases Society of America, 2003).

1.3 MDR-TB e XDR-TB

1.3.1 MDR-TB

O termo MDR-TB ou tuberculose multirresistente é utilizado para definir a tuberculose causada por estirpes de *M. tuberculosis* resistentes pelo menos à isoniazida e à rifampicina, os dois fármacos mais importantes para o tratamento da tuberculose (World Health Organization, 2008a; World Health Organization, 2009a; World Health Organization, 2009b; World Health Organization, 2010a).

Estes dois fármacos, INH e RIF, desempenham um papel extremamente importante no tratamento desta doença e enquanto a resistência a um deles pode ser compensada com o uso de outro fármaco de primeira linha, a resistência a ambos os fármacos (MDR-TB) requer um tratamento com fármacos de segunda linha, as quais são menos eficazes, requerem um tratamento mais prolongado, são mais caros e causam mais efeitos secundários (Dye & Williams, 2000; Sharma & Mohan, 2004).

1.3.2 XDR-TB

O termo tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB) é usado para definir a tuberculose causada por estirpes de *M. tuberculosis* com resistência à rifampicina e à isoniazida (definição de MDR-TB) e adicionalmente com resistência a qualquer das fluoroquinolonas, e a pelo menos um dos seguintes antibióticos injectáveis: capreomicina, canamicina ou amicacina (World Health Organization, 2006; Holtz & Cegielski, 2007). Estas estirpes representam pois uma preocupação acrescida, já que as opções para o seu tratamento são seriamente limitadas, provocam uma alta letalidade e a sua transmissão constitui uma emergência de saúde pública (Mardani, 2007; Alexander & De, 2007).

1.4 Epidemiologia

No início do novo milénio, a tuberculose ainda é considerada uma das doenças infecciosas mais importantes no mundo e um dos maior problema de saúde, mesmo após todos os esforços desenvolvidos nas últimas décadas para a controlar, sendo a segunda maior causa de morte por doenças infecciosas a nível mundial, atrás do VIH/Sida, e a maior causa de morte dos doentes infectados com VIH (Luna, 2003; Young *et al.*, 2008; World Health Organization, 2009a).

Os dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde estimam que em 2008 a tuberculose apresentava uma prevalência de 11,1 milhões de casos e uma incidência de 9,4 milhões de casos, dos quais 1,4 milhões em indivíduos VIH positivos. No que concerne à mortalidade, a OMS estima que em 2008 morreram 1,3 milhões de pessoas de tuberculose, das quais 500 mil eram VIH positivas (World Health Organization, 2009a).

No relatório “Multidrug and Extensively Drug-Resistant TB (M/XDR-TB): 2010 Global Report on Surveillance and Response” a Organização Mundial da Saúde estima que em 2008 a incidência de MDR-TB foi de 444.000 casos (entre 390.000 e 510.000 casos), o que representa 3,6% sobre os casos de incidência de tuberculose em todo o mundo, levando a uma mortalidade estimada de 150.000 pessoas, incluindo as infectadas com VIH (World Health Organization, 2010a).

No que diz respeito aos casos de XDR-TB, em 2008 foram reportados 963 casos à OMS, por 33 países. A comparação destes dados com os de 2007 (772 casos de XDR-TB reportados por 28 países), reforça a ideia que muitos casos de XDR-TB não serão diagnosticados devido à fraca capacidade dos laboratórios para efectuarem testes de resistência aos antibióticos de segunda linha. Assim, a OMS estima que a proporção de casos de XDR-TB entre os MDR-TB será de 5,4% (World Health Organization, 2010a).

Em Portugal, segundo o último relatório da Direcção Geral da Saúde, em 2009 foram diagnosticados 2756 casos de tuberculose, dos quais 2565 são novos casos e 191 retratamentos. Dentro do número total de casos, 2342 foram registados em cidadãos nacionais e 414 em imigrantes. No que concerne à localização da doença, em 72% dos casos diagnosticados, os pulmões foram o órgão atingido. Quanto à incidência de tuberculose multirresistente, 1,7% do número total de casos de 2009 apresentava critérios de MDR-TB (1,2% nos casos novos e 7,5% nos retratamentos). Ainda segundo este mesmo relatório, em Dezembro de 2009 a prevalência de MDR-TB era de 63 casos, 24% dos quais com critérios de XDR-TB, sendo que 68% correspondem a casos na região de Lisboa e Vale do Tejo (Antunes, 2010).

1.5 Resistências aos Antibióticos

As micobactérias utilizam várias estratégias para resistir à acção dos antibióticos. Primeiro, o seu invólucro celular é constituído por uma parede celular altamente hidrofóbica o que resulta na diminuição da permeabilidade a vários compostos. Segundo, possuem também diversos sistemas de efluxo e enzimas de inactivação ou degradação de fármacos (Somoskovi *et al.*, 2001). Contudo, vários estudos mostraram que a resistência em *M. tuberculosis*, ao contrário do que é observado em muitas outras bactérias, desenvolve-se principalmente através da aquisição sequencial de mutações espontâneas nos genes que codificam para o alvo dos antibióticos ou enzimas envolvidas na sua activação. Para além disso, estas bactérias apresentam uma taxa de recombinação baixa e a aquisição de resistência aos fármacos através de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e transposões, foi descrita em micobactérias de crescimento rápidos, mas não em micobactérias de crescimento lento (Brennan, 1995; Riska *et al.*, 2000; Somoskovi *et al.*, 2001; Pillay & Sturm, 2007; Benerjee *et al.*, 2008).

Desta forma, o mecanismo clássico da resistência aos antibióticos em *M. tuberculosis* assenta na selecção de bactérias mutantes com resistência, cujas mutações surgem de forma espontânea e

são propagadas por selecção na presença de concentrações sub-inibitórias de antibióticos, ou seja, por uma antibioterapia inadequada (Narang, 2009; Shenoï & Friedland, 2009). Por sua vez, o fenótipo multirresistente (MDR) ou extensivamente resistente (XDR) é causado pela acumulação de mutações em diferentes genes envolvidos na resistência a cada fármaco (Ramaswamy & Musser, 1998; Gillespie, 2002; Zhang & Yew, 2009).

Neste contexto, a resistência adquirida ocorre quando uma estirpe de *M. tuberculosis* adquire resistência a um ou mais fármacos usados no tratamento da tuberculose, e a resistência primária ocorre quando um doente que nunca esteve sob terapêutica é infectado com uma estirpe já resistente (World Health Organization, 2003).

1.5.1 Isoniazida

A isoniazida ou hidrazina do ácido isonicotínico é um dos principais fármacos de primeira linha usados no tratamento da tuberculose, apresentando actividade exclusivamente contra micobactérias, especialmente micobactérias de crescimento lento (Vilchêze & Jacobs, 2007).

A isoniazida entra na célula por difusão passiva (Bardou, *et al.*, 1998) e é activa apenas em bacilos em replicação, não apresentando actividade contra bacilos que se encontrem em fase estacionária ou crescendo em condições anaeróbias (Vilchêze & Jacobs, 2007; Zhang & Yew, 2009). De facto, este fármaco é um dos agentes mais efectivos, com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 0,05 µg/ml, e específicos para o tratamento das infecções por *M. tuberculosis*, apresentando actividade bacteriostática durante as primeiras 24 horas de tratamento, após as quais, a sua acção é bactericida (Vilchêze & Jacobs, 2007).

Apesar dos numerosos e intensivos estudos, o mecanismo de acção da INH, bem como os mecanismos que conferem resistência a este fármaco são muito complexos e não estão ainda completamente compreendidos (Rattan *et al.*, 1998; Ghiladi *et al.*, 2005). A INH por si só não é

tóxica para a bactéria, mas actua como um pro-fármaco, que requer activação por uma enzima multifuncional da bactéria, a catalase-peroxidase KatG, codificada pelo gene *katG* (Timmins & Deretic, 2006; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009).

A enzima KatG desempenha um papel protector contra agentes oxidantes nocivos para a bactéria, como é o caso do H₂O₂ que se acumula durante a respiração oxidativa (Heym & Caleb, 1997; Heym *et al.*, 1999). A actividade peroxidase da enzima KatG é necessária para a activação da INH numa série de espécies reactivas de oxigénio, radicais orgânicos reactivos e elementos eletrofílicos, que atacam múltiplos alvos no bacilo (Zhang, 2005; Timmins & Deretic, 2006; Zhang & Yew, 2009).

O principal alvo de inibição da INH é a via de síntese dos ácidos micólicos (Winder & Collins, 1970; Banerjee *et al.*, 1994), nomeadamente a enzima enoil-ACP redutase (InhA) dependente de NADH, envolvida na alongação dos ácidos gordos, particularmente no sistema de síntese dos ácidos gordos tipo II (FASII) e codificada pelo gene *inhA* (Zhang, 2005; Vilchèze & Jacobs, 2007; Zhang & Yew, 2009).

A espécie reactiva responsável pela inibição da InhA é o hipotético radical isonicotinoil, um derivado da activação da INH mediada pela enzima KatG, o qual reage com NAD (NAD[•] ou NAD⁺), formando um aducto INH-NAD, que inibe a enzima InhA (Figura 1) (Rozwarski *et al.*, 1998; Zhang, 2005; Vilchèze & Jacobs, 2007; Zhang & Yew, 2009). Esta inibição leva à acumulação de ácidos gordos de cadeia longa, à inibição da biosíntese de ácidos micólicos e por fim, à morte celular (Vilchèze & Jacobs, 2007).

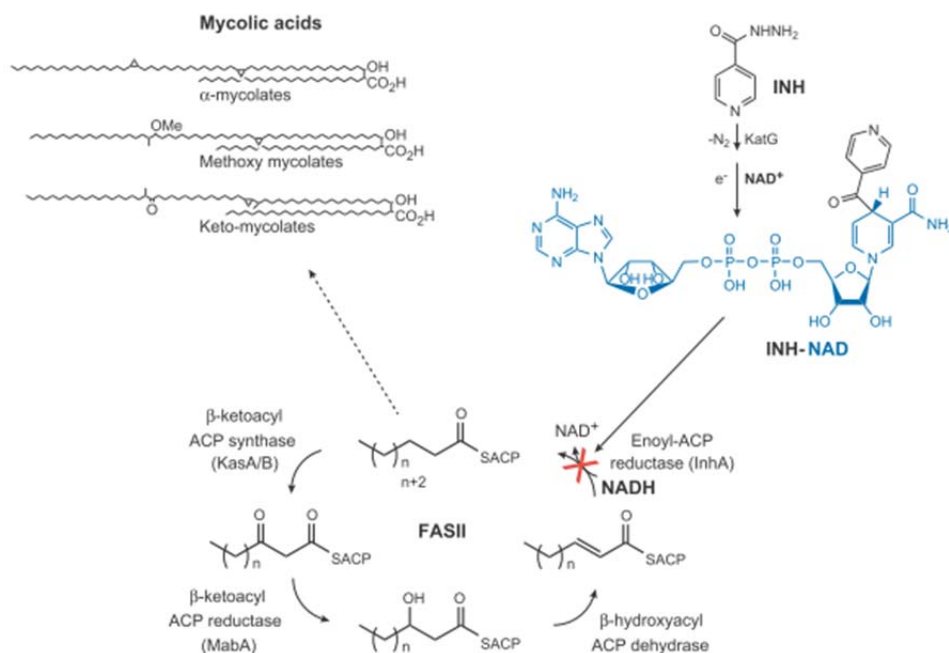


Figura 1. Mecanismo proposto para a acção da isoniazida em *M. tuberculosis*. A INH é activada pela enzima KatG formando um aducto INH-NAD. Este aducto inibe a enzima enoil-ACP redutase, InhA, envolvida no sistema de síntese dos ácidos gordos tipo II (FASII). Esta inibição impede a biosíntese de ácidos micólicos, o que provoca morte celular (adaptado de: Vilchêze & Jacobs, 2007).

A base molecular da resistência à INH envolve uma serie de mutações (inserções, deleções e mutações pontuais) em vários genes. As mais comuns (75 a 85 %) ocorrem no gene *katG* e nas regiões promotora e codificante do gene *inhA*. As mutações nos outros genes (*ndh*, *ahpC*, *kasA*, *nhoA*, entre outros) têm um papel menor na resistência à INH (Ahmad, 2009; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009). Contudo, cerca de 10 a 25% dos isolados com baixo nível de resistência à INH não apresentam mutações em qualquer um destes genes, o que se pode dever a mecanismos de resistência desconhecidos (Cole *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006; Hazbón *et al.*, 2006; Ahmad, 2009; Zhang & Yew, 2009).

katG

A resistência à INH em *M. tuberculosis* na maioria das vezes está associada a mutações no gene *katG* (2223 pb), resultando na diminuição ou perda da actividade da enzima catalase-peroxidase

(Hazbón *et al.*, 2006; Johnson, *et al.*, 2006; Vilchèze & Jacobs, 2007; Ahmad, 2009; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Zhang & Yew, 2009;). A posição das mutações observadas neste gene varia de acordo com a região geográfica, tendo sido reportadas mutações entre os codões 1 a 735 (Wei *et al.*, 2003; Gagneux *et al.*, 2006; Vilchèze & Jacobs, 2007; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Sandgren *et al.*, 2009). As mutações descritas em maior número são as “missense”, seguidas de inserções, deleções, mutações “nonsense”, regiões truncadas e muito raramente deleções totais do gene (Ramaswamy & Musser, 1998; Ramaswamy *et al.*, 2003; Vilchèze & Jacobs, 2007; Sandgren *et al.*, 2009).

A mutação mais comum nos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH e no gene *katG* é a S315T, isto é, a substituição do aminoácido serina do codão 315 por uma treonina (Ramaswamy *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2006; Vilchèze & Jacobs, 2007; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Zhang & Yew, 2009). Estatisticamente a substituição mais comum é a ACG (Ser) → ACC (Thr), no entanto, as substituições ACA (Thr), ATC (Ile), AGA (Arg), CGC (Arg), AAC (Asp) e GGC (Gly) também já foram identificadas em isolados resistentes à INH (Musser, 1995; Ramaswamy & Musser, 1998; Sandgren, Strong *et al.*, 2009). A mutação S315T provoca um nível de resistência à INH relativamente elevado (CMI entre 5 a 10 µg/ml), sem resistência cruzada com a etionamida e diminui a actividade catalase-peroxidase da KatG (Somoskovi *et al.*, 2001; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009). De facto, a substituição do aminoácido serina pela treonina parece permitir um balanço entre a necessidade da bactéria manter a actividade catalase peroxidase para se proteger dos agentes oxidantes nocivos e a necessidade de reduzir a activação da INH a partir do seu fármaco, um processo que em condições normais iria matar a bactéria (Ramaswamy & Musser, 1998; Somoskovi *et al.*, 2001).

Por fim, os isolados de *M. tuberculosis* que possuem mutações menos frequentes no gene *katG* exibem níveis variados de resistência à INH e de actividade catalase peroxidase (Somoskovi *et al.*,

2001). Já no que diz respeito aos isolados com deleções do gene *katG*, estes podem apresentar CMI iguais ou superiores a 50 µg/ml (Pierre-Audigier & Gicquel, 2009).

inhA

A perda da actividade catalase não é por si só a única responsável pela resistência à INH. De facto, a resistência a este fármaco também se pode desenvolver através de alterações ou sobre expressão do seu alvo, a enzima InhA, codificada pelo gene *inhA* (810 pb) (Pierre-Audigier & Gicquel, 2009). Neste caso, a resistência à INH ocorre mediante mutações na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA*, causando sobre expressão de InhA, ou através de mutações no local activo da enzima, as quais diminuem a afinidade desta para o aducto INH-NAD (Figura 2) (Banerjee *et al.*, 1994; Heym *et al.*, 1999; Zhang & Yew, 2009).

As mutações observadas no gene *inhA* e na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* são menos frequentes do que as observadas no gene *katG*, estão usualmente associadas com baixos níveis de resistência (CMIs superiores a 0,2 µg/ml e inferiores ou iguais a 1 µg/ml) (Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Zhang & Yew, 2009) e conferem resistência cruzada ao fármaco estruturalmente análogo à INH, a etionamida, um antibiótico de segunda linha que também inibe a biosíntese de ácidos micólicos (Heym *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2006; Zhang & Yew, 2009;). A frequência relativa destas mutações nos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH varia consideravelmente, dependendo da região geográfica onde o bacilo foi isolado e da etnicidade do doente (Ahmad, 2009).

Até à data foram identificadas, pelo menos, 13 mutações pontuais dentro da região codificante do gene *inhA* (Figura 2), nomeadamente entre os codões 8 e 217 (Ristow *et al.*, 1995; Basso *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Morlock *et al.*, 2003; Vilchèze *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2006; Hai Hua Lin *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2009; Sandgren *et al.*, 2009), tendo sido quase todas elas, com excepção

das mutações I47T e I194T, detectadas apenas em isolados resistentes à INH (Hazbón *et al.*, 2006; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009).

Oito das treze mutações pontuais identificadas na região codificante do gene *inhA*, designadamente as mutações I16T, I21V, I21T, V78A, S94A, S94L, I95P e I95T, encontram-se no local de ligação do NADH à InhA e reduzem a afinidade desta enzima para o cofactor (Basso *et al.*, 1998; Ramaswamy & Musser, 1998; Johnson *et al.*, 2006; Vilchèze & Jacobs, 2007; Sandgren *et al.*, 2009). Contudo, estas mutações na região codificante do gene *inhA* raramente são identificadas em isolados clínicos de *M. tuberculosis*, sendo observadas em apenas 5% dos isolados resistentes à INH (Pierre-Audigier & Gicquel, 2009) e usualmente em co-existência com mutações na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* ou no gene *katG* (Basso *et al.*, 1998; Vilchèze & Jacobs, 2007).

Por seu lado, as mutações na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA*, especificamente entre as posições -5 e -147, relativamente ao local de início da transcrição, são observadas em 8 a 20% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH (Ramaswamy *et al.*, 2003; Vilchèze & Jacobs, 2007; Sekiguchi *et al.*, 2007; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009). Estas mutações são quase todas elas, com excepção da G-17T, detectadas exclusivamente em isolados resistentes à INH (Hazbón, *et al.*, 2006; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009), sendo as mais frequentes observadas nas posições -24 (G-24T), -16 (A-16G), -15 (C-15T) e -8 (T-8G/A) (Rouse *et al.*, 1995; Ramaswamy & Musser, 1998; Lee *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 2005; Rindi *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Sandgren *et al.*, 2009). Dentro destas, a mutação mais comum em isolados clínicos é a -15 (C-15T), a qual aumenta o nível do mRNA *inhA*, causando a sobre expressão da proteína InhA e o aumento da resistência à INH (Vilchèze *et al.*, 2006; Sandgren *et al.*, 2009).

Por fim, os isolados de *M. tuberculosis* que são resistentes à INH através de mutações no gene *inhA* e na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* podem apresentar mutações adicionais no gene *katG*, o que lhes confere um alto nível de resistência à INH (Zhang & Yew, 2009).

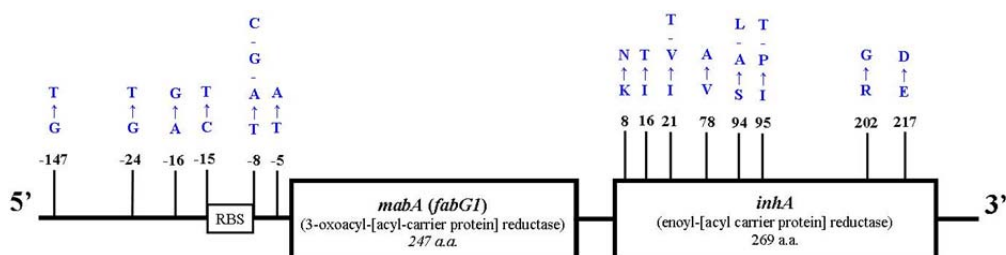


Figura 2. Representação esquemática das mutações identificadas no locus *inhA* em isolados de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida. O locus *inhA* é composto por duas “open reading frames” contíguas, designadas *mabA (fabG1)* e *inhA*. Nos microrganismos do complexo *M. tuberculosis*, os genes *mabA (fabG1)* e *inhA* estão separados por uma região não codificante de 21 pb. RBS: Local de ligação do ribossoma. K - Lisina; N – Asparagina; I – Isoleucina; T – Treonina; V – Valina; A – Alanina; S – Serina; L – Leucina; P – Prolina; R – Arginina; G – Glicina; E – Glutamato; D – Aspartato (adaptado de: Ramaswamy & Musser, 1998; Sandgren *et al.*, 2009).

1.5.2 Rifampicina

A rifampicina é um derivado semi-sintético do composto natural rifamicina, obtido a partir de culturas filtradas de *Streptomyces mediterranei*, que foi introduzido em 1972 no tratamento da tuberculose (Blanchard, 1996; Heym & Caleb, 1997; Rattan *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2006).

Este fármaco pertence à família das ansamicinas, tem propriedades lipofílicas, é um agente antimicrobiano de largo espectro que rapidamente se difunde através da parede celular e que apresenta actividade bactericida contra *M. tuberculosis*, com CMI's entre os 0,05 e 1 µg/ml em meio líquido (Hatfull & Jacobs, 2000; Zhang & Yew, 2009). De facto, a rifampicina é um importante fármaco de primeira linha no tratamento da tuberculose, activa contra bacilos em crescimento ou em fase estacionária com baixa actividade metabólica, o que está relacionado com a sua grande actividade esterilizante *in vivo* (Cole *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Zhang & Yew, 2009). Tais características fazem com que este fármaco seja uma componente chave na terapia contra a tuberculose, permitindo, em combinação com outros fármacos, diminuir o tempo da terapia de 12 a 18 meses para 6 meses (Blanchard, 1996; Riska *et al.*, 2000; Cole *et al.*, 2005; Zhang, 2005).

A rifampicina interfere com a síntese de mRNA através da sua ligação à RNA polimerase dependente de DNA da bactéria, a qual desempenha um papel crucial na transferência de informação, pelo que esta enzima representa um alvo ideal para a terapia, pois a sua inactivação resulta na inibição total das funções bacterianas (Cole, 1996). Este fármaco interfere na síntese de mRNA através da ligação à sub-unidade β da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB*, mais especificamente, na concavidade localizada na parte superior do canal principal de entrada do DNA de dupla cadeia, acima do centro catalítico da polimerase, bloqueando a elongação da cadeia de RNA e consequentemente, a síntese proteica (Hatfull & Jacobs, 2000; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Zhang & Yew, 2009).

Deste modo, a resistência à rifampicina em *M. tuberculosis* está associada a mutações numa região definida do gene *rpoB*, denominada região de determinação de resistência à rifampicina (RRDR de “rifampicin resistance determining region”). Esta região de 81 pb está situada entre os codões 507 e 533 do gene *rpoB* (sistema de numeração do gene *rpoB* da *Escherichia coli*) e codifica 27 aminoácidos – Figura 3 (Telenti *et al.*, 1993). De facto, 90 a 98% dos isolados fenotipicamente resistentes à rifampicina apresentam mutações nesta região específica do gene *rpoB*, sendo na sua maioria mutações pontuais, podendo ocorrer também, mas menos frequentemente, inserções ou deleções – Figura 3 (Blanchard, 1996; Ramaswamy & Musser, 1998; Hatfull & Jacobs, 2000; Jacobs, & Alland, 2000; Riska *et al.*, 2006; Ahmad, 2009; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Zhang & Yew, 2009). A maioria dos isolados resistentes à RIF apresenta apenas uma mutação no gene *rpoB*, no entanto, já foram descritos, embora raramente, isolados com duas a quatro mutações neste gene (Sekiguchi *et al.*, 2007; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009). As mutações mais frequentes afectam os codões 531, 526 e 516 (S531L, H526Y, H526D e D516V), sendo encontradas em 70 a 81% dos isolados resistentes à rifampicina. Destas, as mutações nos codões 526 e 531, usualmente correspondem a um nível elevado de resistência fenotípica à rifampicina (CMI superior a 32 $\mu\text{g/ml}$), bem como a resistência cruzada com outras rifamicinas. As mutações nos codões 511, 516, 518 e 522 resultam em baixos níveis de resistência à rifampicina. Ao mesmo tempo, algumas mutações na

Por fim, como existe uma grande correlação entre as mutações na RRDR do gene *rpoB* e a resistência fenotípica à rifampicina (Riska *et al.*, 2000), e visto que a mono-resistência à rifampicina é rara a nível mundial (World Health Organization, 2008a), a qual está geralmente associada à resistência à isoniazida (Pierre-Audigier & Gicquel, 2009), a detecção de mutações na RRDR do gene *rpoB* pode ser usada como um marcador precoce de MDR (Viveiros *et al.*, 2005).

1.5.3 Etambutol

O etambutol é um importante fármaco de primeira linha utilizado na terapia da tuberculose desde 1966, que apresenta actividade bacteriostática contra bacilos em crescimento e não apresenta qualquer efeito sobre bacilos em fase estacionária (CMIIs variam entre 0,5 a 2 µg/ml) (Heym & Caleb, 1997; Riska *et al.*, 2000; Zhang & Yew, 2009).

Este fármaco inibe na biosíntese de arabinogalactano, o maior polissacárido da parede celular das micobactérias (Takayama & Kilburn, 1989). Ele inibe a polimerização da arabinose em arabinano, componente do arabinogalactano e lipoarabinomanano, induzindo a acumulação de D-arabinofuranosyl-P-decaprenol, um intermediário da biosíntese de arabinano (Wolucka *et al.*, 1994; Mikusová *et al.*, 1995). Aparentemente, o alvo do etambutol em *M. tuberculosis* são as arabinosil-transferases, enzimas envolvidas na síntese de arabinogalactano, as quais são codificadas pelo operão *embCAB*, que contem os genes *embC*, *embA* e *embB*. Estes genes partilham entre si 65% ou mais de homologia entre os aminoácidos que codificam e pensa-se que codificam para proteínas transmembranares (Zhang, 2005; Safi *et al.*, 2008). Desta forma, as mutações no operão *embCAB*, em particular no gene *embB* e ocasionalmente nos genes *embC* e *embA*, são responsáveis pela resistência ao etambutol (Zhang & Yew, 2009).

De facto, a análise de isolados clínicos resistentes ao etambutol veio confirmar que a resistência a este antibiótico está relacionada principalmente com mutações na região de determinação de

resistência ao etambutol (ERDR de “ethambutol resistance determining region”) do gene *embB*, sendo as mutações mais frequentes observadas no codão 306 deste gene. Estas mutações foram encontradas em 30 a 70% dos isolados clínicos resistentes ao etambutol (Hazbón *et al.*, 2005; Parsons *et al.*, 2005; Plinke *et al.*, 2006; Safi *et al.*, 2008; Starks *et al.*, 2009) e provocam geralmente um alto nível de resistência a este fármaco (CMI superior a 20 µg/ml). As substituições mais frequentes no codão 306 são: ATG por GTG (Met306Val); CTG (Met306Leu); ATA (Met306Ile); ATC (Met306Ile) e ATT (Met306Ile) (Riska *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2006; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Sandgren *et al.*, 2009).

A associação entre as mutações no codão 306 do gene *embB* e a resistência ao etambutol em isolados clínicos de *M. tuberculosis* era considerada tão consistente, que a detecção destas mutações foi proposta como um marcador de resistência em testes de diagnóstico (Hazbón *et al.*, 2005; Parsons *et al.*, 2005; Plinke *et al.*, 2006; Safi *et al.*, 2008; Starks *et al.*, 2009). Contudo, vários estudos comprovaram a detecção destas mutações em isolados susceptíveis ao etambutol, pelo que o papel exacto das mutações no codão 306 do gene *embB* na resistência ao etambutol se mantém controverso (Mokrousov *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2007; Safi *et al.*, 2008; Perdigão *et al.*, 2009; Starks *et al.*, 2009).

Todavia, foram encontradas muitas outras mutações no gene *embB*, algumas nos genes *embC* e *embA* e em outros genes, como o *embR*, *Rv0340*, *rmlD* e *rmlA2*, as quais também estão associadas à resistência ao etambutol (Sandgren *et al.*, 2009; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009). Finalmente, aproximadamente 25 a 35% dos isolados resistentes ao etambutol com CMI inferiores a 10 µg/ml, não apresentam mutações nestes genes, sugerindo que podem existir outros mecanismos de resistência a este fármaco (Zhang & Yew, 2009; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009).

1.5.4 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina, levofloxacina, entre outras) são derivados sintéticos do ácido nalidíxico, apresentam actividade bactericida contra *M. tuberculosis* e o seu alvo é a DNA girase, uma topoisomerase do tipo II dependente de DNA, que catalisa o super-enrolamento negativo do DNA (Gay *et al.*, 1984; Wang, 1991; Blanchard, 1996; Ramaswamy & Musser, 1998).

As topoisomerases de DNA fazem parte de um conjunto de enzimas responsáveis pela manutenção dos cromossomas no estado topológico apropriado. Na célula, estas enzimas regulam o super-enrolamento do DNA e desenrolam as cadeias de ácidos nucleicos de acordo com as necessidades de replicação ou de transcrição da célula, pelo que na maioria das bactérias, a inibição da sua actividade resulta na morte do microrganismo. Em *M. tuberculosis*, a topoisomerase do tipo II dependente de DNA é uma proteína tetramérica composta por duas subunidades A e duas subunidades B (A₂B₂) codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. A subunidade A contem o local activo da enzima e a subunidade B promove a hidrólise do ATP (Takiff *et al.*, 1994; Blanchard, 1996; Ramaswamy & Musser, 1998; Johnson *et al.*, 2006; Zhang & Yew, 2009).

A maioria dos isolados clínicos resistentes às fluoroquinolonas apresentam mutações numa região conservada dos genes *gyrA* e *gyrB*, denominada de região de determinação de resistência as fluoroquinolonas (QRDR de “quinolone-resistance determining region”) (Takiff *et al.*, 1994; Blanchard, 1996; Ramaswamy & Musser, 1998; Johnson *et al.*, 2006; Zhang & Yew, 2009).

Vários estudos mostraram que a maioria dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes às fluoroquinolonas apresentam mutações na QRDR do gene *gyrA*, nomeadamente, entre os codões 74 e 109. As principais mutações encontradas localizam-se nos codões 88, 90, 91 e 94 (Figura 4) e conferem um elevado nível de resistência a estes antibióticos, sendo as mutações mais comuns encontradas no codão 94 (D94G/A) e no codão 90 (A90V) (Siddiqi *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004; Bozeman *et al.*, 2005; Aubry *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2006; Antonova *et al.*, 2008; Benerjee *et al.*,

2008; Mokrousov *et al.*, 2008; van Doorn *et al.*, 2008; Hillemann *et al.*, 2009). Por outro lado, a mutação no codão 95 (substituição de uma serina por uma treonina) é considerada um polimorfismo, não estando relacionado com a resistência às fluoroquinolonas (Sreevatsan *et al.*, 1997; Siddiqi *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2006).

As mutações na QRDR do gene *gyrB*, compreendida entre os codões 457 e 549, são raras e estão associadas a um baixo nível de resistência às fluoroquinolonas (Takiff *et al.*, 1994; Siddiqi *et al.*, 2002; Pitaksajjakul *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007).

Os isolados que apresenta um elevado nível de resistência às fluoroquinolonas possuem usualmente mutações múltiplas nestes dois genes, como por exemplo, duas mutações no gene *gyrA* ou mutações concomitantes no gene *gyrA* e *gyrB* (Takiff *et al.*, 1994; Kocagöz *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2006; Sekiguchi *et al.*, 2007).

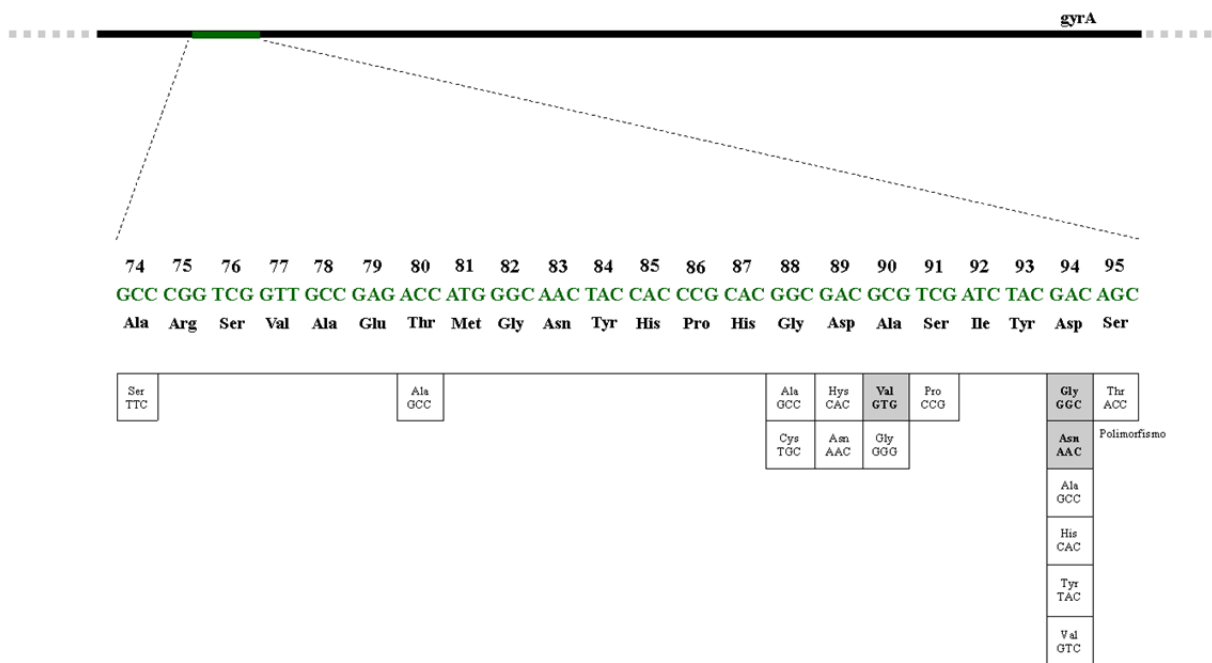


Figura 4. Principais mutações observadas no gene *gyrA* de isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes às fluoroquinolonas. A verde encontra-se a QRDR (região de determinação de resistências as fluoroquinolonas de “quinolone-resistance determining region”), compreendida entre os codões 74 e 95 do gene *gyrA*. A numeração dos codões e os aminoácidos correspondentes está apresentada a preto. Na parte de baixo da imagem, a preto encontram-se as mutações e os aminoácidos correspondentes. A negrito e dentro das caixas cinzas estão sinalizadas as mutações mais frequentes: A90V, D94G e D94A. Ala: alanina; Arg: arginina; Asn: asparagina; Asp : ácido aspártico; Cys: cisteína; Gln: glutamina; Glu: glutamato; Gly: glicina; His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Lys: lisina; Met: metionina; Phe: fenilalanina; Pro: prolina; Ser: serina; Thr: treonina; Trp: triptofano; Tyr: tirosina; Val: valina (adaptado de: Pierre-Audigier & Gicquel, 2009 com revisão das mutações a partir de Sandgren *et al.*, 2009).

1.5.5 Aminoglicosídeos e Péptidos Cíclicos

Os aminoglicosídeos (canamicina e amicacina) e os péptidos cíclicos (viomicina e capreomicina) são antibióticos injectáveis de segunda linha muito importantes para o tratamento de doentes com tuberculose multirresistente (Maus *et al.*, 2005b). A canamicina e o seu derivado, a amicacina, inibem a síntese proteica através de um mecanismo de modificação estrutural do ribossoma. As mutações na extremidade 3' do gene *rrs*, que codifica para o 16S rRNA estão associadas a um elevado nível de resistência a estes dois fármacos, particularmente nas posições 1401 (A→G), 1402 (C→T) e 1484 (G→T) (Taniguchi *et al.*, 1997; Alangaden *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1998; Jugheli *et al.*, 2009; Zhang & Yew, 2009).

No que diz respeito aos péptidos cíclicos (viomicina e capreomicina), estes fármacos interferem com várias funções do ribossoma, pois impedem a formação do complexo de iniciação da subunidade 30S e bloqueiam a translocação do tRNA do local A para o local P. As mutações na extremidade 3' do gene *rrs*, estão associadas à resistência a estes fármacos, particularmente nas posições 1401 (A→G), 1402 (C→T) e 1484 (G→T), tal como para os aminoglicosídeos. Para além disso, a ocorrência de mutações no gene *tlyA*, que codifica para uma metiltransferase de rRNA, têm sido também associada à resistência aos péptidos cíclicos. Esta enzima modifica o nucleótido citosina na posição 1409 na hélice 44 do 16S rRNA e o nucleótido citosina na posição 1920 na hélice 69 do 23S rRNA, sendo a perda destas metilações no rRNA o suficiente para conferir resistência a estes dois fármacos (Maus *et al.*, 2005a; Johansen *et al.*, 2006; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Zhang & Yew, 2009).

1.6 Diagnóstico

De um modo geral, o tempo desde a recepção da amostra até ao resultado do teste de sensibilidade aos antibióticos é aproximadamente de um mês, devido ao lento crescimento de *M. tuberculosis*. Os testes de susceptibilidade aos antibióticos de segunda linha são geralmente pedidos quando se observa resistência aos de primeira linha, requerendo mais duas a quatro semanas adicionais (Benerjee *et al.*, 2008; World Health Organization, 2008b; Young *et al.*, 2008).

Neste sentido, novas tecnologias que permitam a rápida detecção da resistência aos antibióticos tornaram-se uma prioridade na investigação, tendo sido desenvolvidos diversos ensaios moleculares para a detecção rápida de estirpes resistentes aos antibióticos de primeira linha, o que apenas se tornou possível após a identificação das mutações responsáveis pelas resistências (Benerjee *et al.*, 2008; Migliori *et al.*, 2008; World Health Organization, 2008b). Estes ensaios moleculares, baseados na amplificação de ácidos nucleicos, em conjunto com a sequenciação ou métodos de hibridação, podem fornecer resultados em horas ou poucos dias, sem necessidade de crescimento do microrganismo (Migliori *et al.*, 2008).

A sequenciação directa é outra abordagem para a detecção de mutações, no entanto, é um processo dispendioso, demorado e não está disponível em todos os laboratórios. Técnicas como o “Real Time” PCR, que utilizam “primers” de sequências selvagens para amplificar genes e permitir o uso de sondas específicas para identificar as mutações são caras e complexas, apesar de serem altamente específicas e sensíveis. As técnicas baseadas na hibridação reversa, referidas como testes de hibridação, representam uma ferramenta útil pelo seu custo e eficiência superior. Estes testes são baseados no PCR ou “Multiplex” PCR, em combinação com a hibridação de sondas específicas para sequências selvagens e alteradas de genes envolvidos na resistência aos antibióticos, mostrando uma alta especificidade e uma sensibilidade média a alta (Migliori *et al.*, 2008; Hillemann *et al.*, 2009).

Actualmente os dois principais testes baseados na hibridação de sondas disponíveis comercialmente são o INNO-LiPA Rif. TB (Innogenetics, Ghent, Bélgica) e o GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, GmbH, Nehren, Alemanha), os quais foram recentemente aprovados pela Organização Mundial da Saúde como ferramentas de diagnóstico rápido para a MDR-TB (World Health Organization, 2008b; Hillemann *et al.*, 2009; Sandgren *et al.*, 2009). Muito recentemente foi apresentado um novo teste que permite identificar a resistência do complexo *M. tuberculosis* às fluoroquinolonas, aminoglicosídeos/péptidos cíclicos e ao etambutol, o GenoType MTBDRsl (Hain Lifescience, GmbH, Nehren, Alemanha) (Hain Lifescience, 2010).

2 Objectivos

Nesta dissertação propomo-nos identificar por métodos de detecção molecular rápida o complexo *M. tuberculosis* e a presença de mutações que confirmam resistência aos principais fármacos de primeira linha (isoniazida, rifampicina, etambutol) e de segunda linha (fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e péptidos cíclicos) com base em isolados laboratoriais e amostras respiratórias com baciloscopia positiva. Para tal irão ser testados e avaliados três sistemas de detecção molecular baseados no princípio da hibridação reversa: o INNO-LiPA Rif. TB, o GenoType MTBDRplus e o GenoType MTBDRsl. Numa primeira fase, pretende-se avaliar o desempenho de cada sistema de detecção molecular na identificação do complexo *M. tuberculosis* e na detecção das mutações mais frequentemente associadas à resistência aos fármacos de primeira e segunda linha a partir de culturas. Numa segunda fase, pretende-se avaliar o desempenho de cada um dos sistemas quando aplicados directamente a amostras respiratórias. Deste modo pretende-se seleccionar o sistema mais específico e sensível para a detecção directa de MDR-TB e XDR-TB e comparar os resultados obtidos com o algoritmo de trabalho em uso no laboratório de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

3 Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Estirpe de Referência

A estirpe de *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), usada neste trabalho como estirpe de referência, é um derivado da estirpe virulenta H37, obtido em 1934 por William Steenken e mantida desde então em coleção laboratorial no Trudeau Institute, Saranac Lake, em New York e posteriormente na *American Type Culture Collection* (Bifani, *et al.*, 2000; Zheng, *et al.*, 2008; American Type Culture Collection, 2009).

3.1.2 Isolados Clínicos

Neste trabalho foram utilizados DNAs de 21 isolados clínicos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, provenientes da coleção de culturas do laboratório de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, UNL) – Tabela 1. Estas culturas foram previamente isoladas pelo método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson, Sparks, E.U.A.) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por AccuProbe (Gen-Probe Incorporated, San Diego, E.U.A.).

Quanto à sua distribuição por ano de isolamento, oito isolados eram do ano de 2009, cinco do ano de 2008 e mais cinco do ano de 2007. Os três isolados restantes eram dos anos de 1995, 2003 e 2005, ou seja um de cada ano (Tabela 1).

No que diz respeito à resistência aos antibióticos de primeira linha, previamente estabelecida por testes fenotípicos de susceptibilidade, efectuados pelo método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson), 20 isolados eram multirresistentes, i.

e., com resistência pelo menos à rifampicina e isoniazida, e um isolado era mono-resistente à rifampicina (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados clínicos estudados.

Nº do isolado	Ano	Identificação ⁽¹⁾	Método convencional de susceptibilidade em cultura ⁽²⁾
1	1995	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^R
2	2003	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^S ; RIF ^R ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S
3	2005	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^S
4	2007	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^S ; EMB ^R ; PZA ^R
5	2007	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R
6	2007	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R
7	2007	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R
8	2007	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^R
9	2008	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^S
10	2008	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R
11	2008	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R
12	2008	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R
13	2008	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^S ; EMB ^R ; PZA ^R
14	2009	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S
15	2009	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S
16	2009	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R
17	2009	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R
18	2009	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^R
19	2009	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^R
20	2009	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S
21	2009	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S

(1): Pelo Sistema AccuProbe (Gen-Probe Incorporated); (2) BACTEC MGIT 960TB; S: Sensível; R: Resistente; INH: Isoniazida; RIF: Rifampicina; STR: Estreptomicina; EMB: Etambutol; PZA: Pirazinamida

3.1.3 Amostras Clínicas

Foi estudado um conjunto de 33 amostras respiratórias com baciloscopia positiva para bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR), enviadas ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, UNL), durante o período de Janeiro de 2010 a Outubro de 2010, por dois hospitais da região de Lisboa (Tabela 2).

Das 33 amostras, 17 foram provenientes do Hospital A e 16 do Hospital B (Tabela 2).

Quanto à caracterização do tipo de amostras, 17 eram expectorações, 14 secreções brônquicas e dois lavados broncoalveolares (Tabela 2).

Tabela 2. Amostras clínicas estudadas.

Nº da amostra	Ano	Tipo de amostra	Hospital
1	2010	Expectoração	Hospital B
2	2010	Expectoração	Hospital A
3	2010	Expectoração	Hospital A
4	2010	Lavado Broncoalveolar	Hospital A
5	2010	Expectoração	Hospital A
6	2010	Expectoração	Hospital A
7	2010	Secreções Brônquicas	Hospital B
8	2010	Secreções Brônquicas	Hospital B
9	2010	Expectoração	Hospital B
10	2010	Expectoração	Hospital A
11	2010	Secreções Brônquicas	Hospital B
12	2010	Secreções Brônquicas	Hospital B
13	2010	Expectoração	Hospital B
14	2010	Secreções Brônquicas	Hospital A
15	2010	Secreções Brônquicas	Hospital B
16	2010	Secreções Brônquicas	Hospital A
17	2010	Secreções Brônquicas	Hospital B
18	2010	Secreções Brônquicas	Hospital A
19	2010	Expectoração	Hospital B
20	2010	Expectoração	Hospital A
21	2010	Expectoração	Hospital B
22	2010	Expectoração	Hospital A
23	2010	Expectoração	Hospital B
24	2010	Secreções Brônquicas	Hospital A
25	2010	Expectoração	Hospital B
26	2010	Secreções Brônquicas	Hospital A
27	2010	Lavado Broncoalveolar	Hospital A
28	2010	Expectoração	Hospital A
29	2010	Secreções Brônquicas	Hospital A
30	2010	Expectoração	Hospital B
31	2010	Secreções Brônquicas	Hospital B
32	2010	Secreções Brônquicas	Hospital B
33	2010	Expectoração	Hospital A

3.1.4 Outro Material Biológico

3.1.4.1 Marcadores de Peso Molecular

Foram utilizados como referência na análise de produtos de PCR por electroforese em gel de agarose os marcadores de peso molecular GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc, Burlington, Canadá) e GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc), ambos na concentração de 0,5 µg/µl.

3.1.4.2 “Primers”

Os “primers” utilizados na amplificação e sequenciação de um fragmento interno do gene *rpoB*, encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Sequência nucleotídica e gene alvo dos “primers” utilizados no trabalho.

Gene alvo	“primers”	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Referências
<i>rpoB</i>	RPOB-1	GGGAGGGGATGACCACCCA	Portugal <i>et al.</i> , 1999; Johansen <i>et al.</i> , 2003
	RPOB-2	GCGGTACGGCGTTTCGATGAAC	

3.1.5 Soluções e Enzimas

A preparação e a composição das soluções e enzimas utilizadas ao longo do trabalho encontram-se descrita nas Tabelas 4 e 5.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada autoclavada e esterilizadas por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos a 1 bar.

Tabela 4. Enzimas utilizadas.

Enzimas	Concentração
Proteinase K ⁽¹⁾ (utilizada na extração de DNA genómico)	Solução “stock” 20 mg/ml Mantida à temperatura ambiente
<i>Taq</i> DNA Polimerase ⁽²⁾	5 U/ μ l Mantida a -20°C
HotStar <i>Taq</i> DNA Polimerase ⁽¹⁾	5 U/ μ l Mantida a -20°C

(1) Qiagen, E.U.A.; (2) Innogenetics, Bélgica;

Tabela 5. Composição e modo de preparação de soluções.

Solução	Composição
TE 1X	10 mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0
TAE 1X	40mM Tris-Acetato; 1mM EDTA pH 8 Solução “stock” a 50X
Brometo de etídeo (EtBr) 10mg/ml	10 mg/ml em água bidestilada estéril Armazenar ao abrigo da luz a 4° C

3.2 Métodos

3.2.1 Algoritmo usado na pesquisa de *M. tuberculosis* por métodos moleculares em amostras respiratórias com baciloscopia positiva

Na Figura 5 encontra-se esquematizado o algoritmo de trabalho utilizado no laboratório de Micobactérias do IHMT, UNL, na pesquisa de *M. tuberculosis* por métodos moleculares em amostras respiratórias com baciloscopia positiva. Resumidamente, o protocolo compreende as seguintes etapas (Viveiros *et al.*, 2005):

- 1) Pesquisa de BAAR através da coloração de Ziehl-Neelsen;
- 2) Homogeneização e descontaminação das amostras pelo método convencional N-Acetil-L-Cisteína – Hidróxido de sódio (Kent & Kubica, 1985);
- 3) Inoculação das amostras em meio de Lowenstein-Jensen e meio MGIT para o BACTEC MGIT 960 (Becton and Dickinson);
- 4) Extração de DNA com o “QIAamp® DNA mini kit” (Qiagen, E.U.A.);
- 5) Detecção do complexo *M. tuberculosis* e detecção de mutações no gene *rpoB* com o sistema INNO-LiPA Rif. TB;
- 6) Confirmação ou identificação de espécie após a obtenção de cultura com o sistema AccuProbe (Gen-Probe Incorporated) e quando necessário com os sistemas Genotype CM/AS (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemanha);
- 7) Em caso de identificação positiva para o complexo *M. tuberculosis*, realização de testes de susceptibilidade fenotípica aos antibióticos de primeira linha (isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomicina e pirazinamida), pelo método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson).

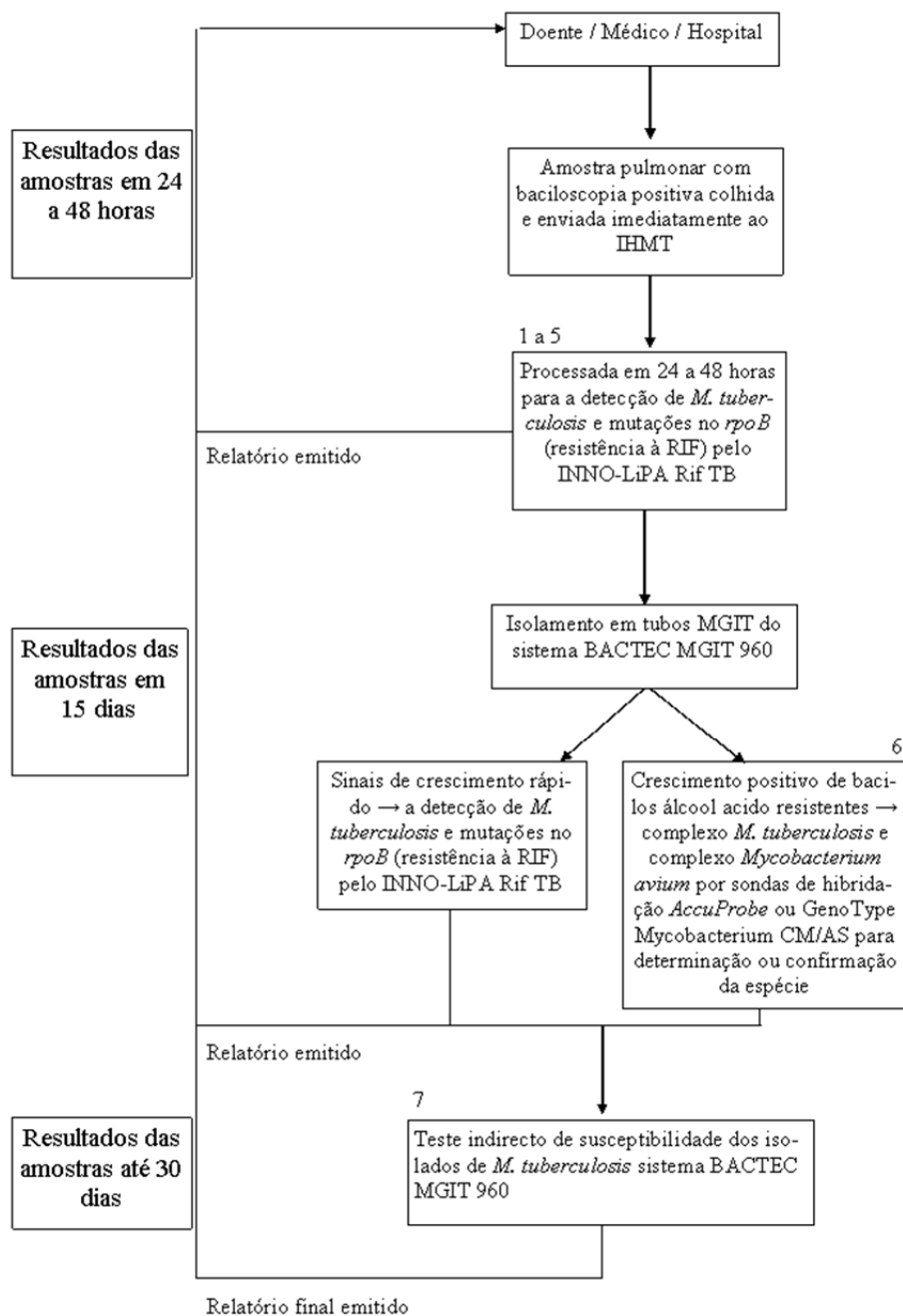


Figura 5. Algoritmo de trabalho do laboratório de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina, usado na pesquisa de *M. tuberculosis* por métodos moleculares em amostras respiratórias com baciloscopia positiva (adaptado de: Viveiros *et al.*, 2005).

3.2.2 Extracção de DNA Genómico

A extracção de DNA genómico foi realizada a partir de amostras respiratórias com baciloscopia positiva, previamente homogeneizadas e descontaminadas pelo método de N-Acetil-L-Cysteina – Hidróxido de sódio (Kent & Kubica, 1985), usando o “QIAamp® DNA mini kit” (Qiagen, E.U.A.).

Resumidamente, o método consiste na extracção de DNA segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, com algumas alterações, como a seguir descrito. Uma alíquota de 1 ml das amostras descontaminadas foi centrifugada durante 10 minutos a 13000 rotações por minuto (rpm) (Biofuge pico Heraeus, DJB Labcare Ltd, Reino Unido), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 1 ml de tampão TE. Esta suspensão foi novamente centrifugada durante 10 minutos a 13000 rpm. Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 200 µl de tampão TE, e a suspensão resultante incubada a 95° C durante 20 minutos. Depois da incubação, adicionaram-se 20 µl de Proteinase K (Qiagen) e 200 µl de tampão AL levando-se ao vortex e incubando-se a 56° C durante 10 minutos. Posteriormente adicionaram-se 200 µl de Etanol (96-100%) (Riedel de Haën, Alemanha) e a suspensão foi homogeneizada no vortex. Após a homogeneização, a suspensão foi transferida para a coluna QUIAamp e lavada com os tampões AW1 e AW2. A solução contendo o DNA foi eluída por centrifugação com 200 µl de tampão AE.

3.2.3 INNO-LiPA Rif. TB

O INNO-LiPA Rif. TB (Innogenetics, Bélgica) é um ensaio comercial de sondas em bandas (LiPA, de “Line Probe Assay”) para utilização *in vitro*, que permite detectar o DNA de micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* e várias mutações no gene *rpoB* (codões 509 a 534) relacionadas com a resistência à rifampicina (Figura 6), após amplificação do DNA extraído das bactérias em cultura ou directamente de amostras (Rossau *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 2005; Innogenetics, 2007).



Figura 7. Ilustração da posição das diferentes sondas oligonucleotídicas na tira de nitrocelulose do sistema de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB. A linha de marcação vermelha no topo da tira (marcador colorido) serve apenas para orientação. A linha do controlo do conjugado fornece um controlo interno para o desenvolvimento de cor. A linha “complexo MTB” corresponde à sonda específica para o complexo *M. tuberculosis*. As cinco linhas S (S1, S2, S3, S4, S5) correspondem às sondas específicas para sequências selvagens do gene *rpoB*. As linhas R (R2, R4a, R4b e R5), correspondem às sondas específicas para as mutações D516V, H526Y, H526D e S531L, respectivamente (adaptado de: Innogenetics, 2007).

Este sistema baseia-se no princípio de hibridação reversa (Innogenetics, 2007), no qual o DNA extraído de culturas ou amostras clínicas é amplificado com “primers” biotinizados, por forma a amplificar a região de resistência à rifampicina do gene *rpoB*. Os produtos biotinizados resultantes da PCR são depois hibridados em condições estritamente controladas com sondas oligonucleotídicas específicas, imobilizadas como bandas paralelas nas tiras de nitrocelulose (Rossau *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 2005; Innogenetics, 2007). Após a hibridação, a estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina é adicionada e liga-se a quaisquer híbridos biotinizados formados anteriormente. A incubação com um substrato cromogénio produz um precipitado púrpura/castanho que pode ser detectado visualmente (Innogenetics, 2007).

Os isolados de *M. tuberculosis* detectados com este kit são considerados susceptíveis se todas as sondas selvagens apresentarem um sinal positivo e se as sondas R não apresentarem qualquer sinal. A presença de mutações ligadas à resistência à rifampicina é indicada através da ausência de reacção com uma ou mais sondas selvagens. Quando a resistência à rifampicina se deve a uma das

mutações mais frequentes no gene *rpoB*, é observada uma reacção positiva com uma das quatro sondas R (Rossau *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 2005).

3.2.3.1. INNO-LiPA Rif. TB - Amplificação

A amplificação foi efectuada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, com algumas adaptações para detecção directa a partir de amostras respiratórias. Concisamente, a amplificação consistiu num “Nested” PCR com dois pares de “primers” biotinilados, os “outer LiPA primers” e os “inner LiPA primers” (Viveiros *et al.*, 2005).

Para a amplificação do primeiro fragmento da região de resistência à rifampicina do gene *rpoB*, as reacções de PCR foram preparadas adicionando 5µl de DNA total extraído a uma mistura reaccional de 45µl contendo: 10µl de tampão de amplificação (Innogenetics); 10µl de solução de MgCl₂ (Innogenetics), 10µl de “primers Mix Outer” (Innogenetics); 0,2µl (1 U) de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas International Inc, Burlington, Canadá) e 14,8µl de água bidestilada esterilizada por autoclavagem (Viveiros *et al.*, 2005).

Para a segunda amplificação, as reacções de PCR foram preparadas adicionando 1µl do produto da primeira amplificação a uma mistura reaccional de 49µl, contendo: 10µl de tampão de amplificação (Innogenetics); 10µl de solução de MgCl₂ (Innogenetics), 10µl de “primers Mix” (Innogenetics); 0,2µl (1 U) de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas International Inc) e 18,8µl de água bidestilada esterilizada por autoclavagem (Viveiros *et al.*, 2005).

As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e seguiram o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C durante 1 minuto, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, emparelhamento a 62°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos, terminando com um passo de extensão final a 72°C durante 10 minutos (Viveiros *et al.*, 2005).

Os produtos da amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) a 2% (p/v) com 0,25 µg/ml de brometo de etídeo, em tampão TAE 1X e com voltagem constante de 65 V durante 45 minutos. Foi utilizado como marcador de peso molecular o GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-doc XR (Bio-Rad, Milão, Itália).

3.2.3.2 INNO-LiPA Rif. TB – Hibridação/Lavagem Restringente/ Revelação da cor

O protocolo de Hibridação/ Lavagem Restringente/ Revelação da cor foi efectuado segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. Sinteticamente, 10µl do produto da 2ª amplificação foram desnaturados à temperatura ambiente, durante 5 minutos, com a adição de 10µl da solução de desnaturação. Seguiu-se uma incubação com agitação, com 1ml da solução de hibridação a 62°C, durante 30 minutos. Após a hibridação, efectuou-se uma lavagem restringente com 1ml da solução *Stringent* durante 10 minutos a 62°C com agitação, seguindo-se duas lavagens com agitação, com 1 ml da solução de *Rinse* e uma incubação com 1ml da solução de conjugado diluído durante 30 minutos à temperatura ambiente, com agitação. Após a incubação, efectuaram-se duas lavagens, com 1 ml da solução de *Rinse* e uma lavagem com 1ml da solução de tampão de substrato. Adicionou-se depois 1 ml da solução de substrato diluído e incubou-se, entre 3 a 30 minutos, com agitação, até ao aparecimento de sinais de revelação. A reacção de revelação foi interrompida com duas lavagens com água destilada durante 3 minutos. Os padrões de hibridação foram analisados com a ajuda de uma matriz fornecida pelo fabricante do sistema – Figura 7 (Innogenetics, 2007).

3.2.4 GenoType MTBDRplus

O teste GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemanha) desenvolvido pela Hain Lifescience é baseado na tecnologia “DNA•STRIP[®]” e permite a identificação genética do complexo *M. tuberculosis* e de mutações ligadas à resistência à rifampicina e/ou isoniazida a partir de bactérias em cultura ou em amostras pulmonares com baciloscopia positiva. A identificação de mutações ligadas à resistência é facultada pela detecção das mutações mais frequentes do gene *rpoB*. Para testar as mutações ligadas à resistência de alto nível à isoniazida é examinado o gene *katG*, enquanto para testar mutações ligadas à resistência de baixo nível à isoniazida é examinada a região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* (Hain Lifescience, 2009).

O procedimento completo é dividido em três passos: extração do DNA a partir de culturas ou amostras clínicas; amplificação por “Multiplex” PCR com “primers” biotinizados e hibridação reversa. A hibridação inclui os seguintes passos: desnaturação química dos produtos de amplificação; hibridação dos produtos de amplificação, em cadeia única e marcados com biotina, a sondas ligadas à membrana; lavagem restrigente; adição de um conjugado de streptavidina/fosfatase alcalina; e uma reação com produção de cor mediada pela fosfatase alcalina (Hain Lifescience, 2009).

As tiras do teste GenoType MTBDRplus (Figura 8) contêm um total de 27 zonas de reação: controlo do conjugado; controlo de amplificação; uma sonda para o complexo *M. tuberculosis*; uma sonda controlo do gene *rpoB*; oito sondas para sequências selvagens do gene *rpoB*; quatro sondas para mutações específicas no gene *rpoB*; uma sonda controlo do gene *katG*; uma sonda para a sequência selvagem do gene *katG*; duas sondas para mutações específicas no gene *katG*; uma sonda controlo do gene *inhA*; duas sondas para sequências selvagens do gene *inhA* e quatro sondas para mutações específicas no gene *inhA* (Hain Lifescience, 2009).

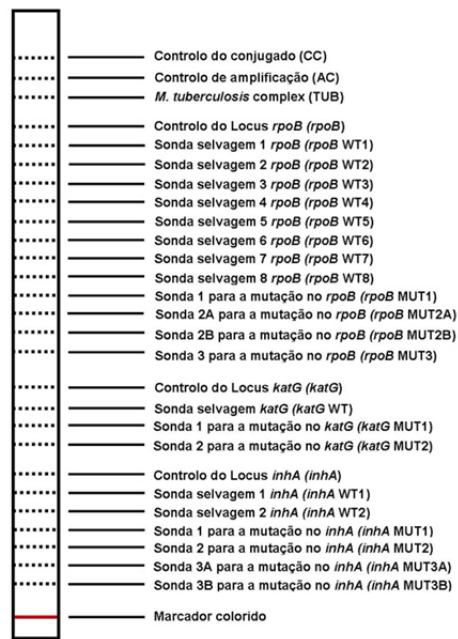


Figura 8. Ilustração da tira do sistema de detecção molecular GenoType MTBDRplus (adaptado de: Hain Lifescience, 2009).

As sondas selvagens para o gene *rpoB* compreendem a região entre os codões 505 a 533 do respectivo gene (Figura 9), com a sonda *rpoB* WT1 a abranger a região entre os codões 505 a 509, a sonda *rpoB* WT2 a região entre os codões 509 a 513, a sonda *rpoB* WT3 a região entre os codões 513 a 517, a sonda *rpoB* WT4 a região entre os codões 516 a 519, a sonda *rpoB* WT5 a região entre os codões 518 a 522, a sonda *rpoB* WT6 a região entre os codões 522 a 525, a sonda *rpoB* WT7 a região entre os codões 525 a 530 e a sonda *rpoB* WT8 a região entre os codões 530 a 533. No que diz respeito às sondas para as mutações (Figura 9), a sonda *rpoB* MUT1 identifica a mutação D516V no codão 516, a sonda *rpoB* MUT2A identifica a mutação H526Y no codão 526, enquanto a sonda *rpoB* MUT2B identifica a mutação H526D no mesmo codão e a sonda *rpoB* MUT3 identifica a mutação S531L no codão 531 (Hain Lifescience, 2009).

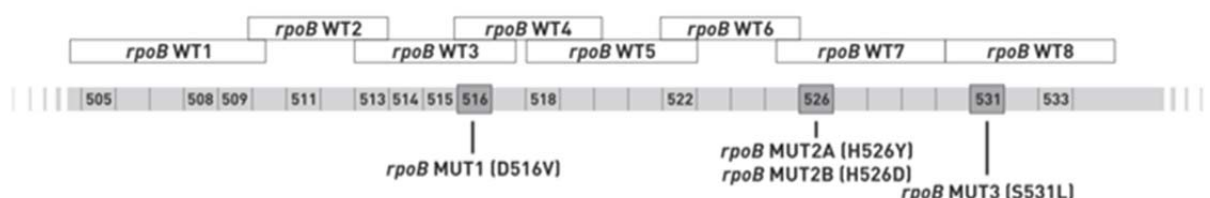


Figura 9. Representação esquemática da região de determinação de resistência à rifamicina (RRDR de “rifampicin resistance determining region”) no gene *rpoB* e das posições das sondas do sistema MTBDRplus. *rpoB* WT1 a 8: sondas *rpoB* tipo selvagem; *rpoB* MUT 1 a 3: sondas de mutação no *rpoB*. Os números dentro das caixas cinzas mais escuras especificam as posições dos códons para as quais as sondas de mutação foram desenhadas, nomeadamente os códons 516 (D516V), 526 (H526Y, H526D) e 531 (S531L) (adaptado de: Hain Lifescience, 2009).

Para o gene *katG* existe apenas uma sonda com sequência selvagem (*katG* WT) e duas sondas para mutações, a sonda *katG* MUT1 que identifica a mutação S315T1 no códon 315 e a sonda *katG* MUT2 que identifica a mutação S315T2 neste mesmo códon – Tabela 6 (Hain Lifescience, 2009).

Tabela 6. Sonda selvagem e de mutação do sistema MTBDRplus para o gene *katG* e mutações correspondentes (adaptado de: Hain Lifescience, 2009).

Sonda selvagem	Codão	Sondas de mutação	Mutação ^(1,2)
katG WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

(1) S: serina; T: treonina; (2) o kit distingue duas mutações que resultam na mesma substituição (S315T).

Por fim, para a região promotora do operão *mabA (fabG1) / inhA* existem duas sondas com sequências selvagens, a *inhA* WT1 e a *inhA* WT2, e quatro sondas para mutações, nomeadamente, a *inhA* MUT1, que identifica a mutação C-15T, a *inhA* MUT2, que identifica a mutação A-16G, a *inhA* MUT3A, que identifica a mutação T-8C e a *inhA* MUT3B, que identifica a mutação T-8A – Tabela 7 (Hain Lifescience, 2009).

Tabela 7. Sondas selvagens e de mutação do sistema MTBDRplus para a região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* e mutações correspondentes (adaptado de: Hain Lifescience, 2009).

Sondas selvagens	Nucleótidos	Sondas de mutação	Mutação ⁽¹⁾
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A-16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T-8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T-8A

(1) C: citosina; T: timina; A: adenina; G: guanina;

3.2.4.1 GenoType MTBDRplus - Amplificação

A amplificação foi efectuada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, incluindo a utilização de uma polimerase específica (HotStarTaq DNA Polimerase, da Qiagen), como sugerido. Concisamente, as reacções do “Multiplex” PCR foram preparadas adicionando 5µl de DNA total extraído a uma mistura reaccional de 45µl, contendo: 5µl de tampão 10X (contém 15 mM MgCl₂) da enzima HotStarTaq DNA Polimerase (Qiagen); 2µl de solução 25 mM MgCl₂ da enzima HotStarTaq DNA Polimerase (Qiagen), 35µl de “Primer Nucleotid Mix (PNM)” (Hain Lifescience GmbH); 0,2µl (1 U) de HotStarTaq DNA Polimerase (Qiagen) e 3µl de água bidestilada esterilizada por autoclavagem (Hain Lifescience, 2009).

As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador Mastercycler Personal e seguiram o seguinte programa: desnaturação inicial a 95 C durante 15 minutos, seguida de 10 ciclos de desnaturação a 95 C durante 30 segundos e emparelhamento a 58 C durante 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95 C durante 25 segundos, emparelhamento a 53 C durante 40 segundos e extensão a 70 C durante 40 segundos, terminando com um passo de extensão final a 70 C durante 8 minutos (Hain Lifescience, 2009).

Os produtos da amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) com 0,25 µg/ml de brometo de etídeo, em tampão TAE 1X e com voltagem constante de 65 V

durante 45 minutos. Foi utilizado como marcador de peso molecular o GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder. Os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-doc XR.

3.2.4.2 GenoType MTBDRplus - Hibridação

A hibridação foi efectuada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. Resumidamente, 20µl do produto amplificado foram desnaturados à temperatura ambiente durante 5 minutos com a adição de 20µl da solução de desnaturação (Hain Lifescience GmbH), seguindo-se uma incubação com agitação com 1ml da solução de hibridação a 45°C durante 30 minutos. Após a hibridação, efectuou-se uma lavagem com 1 ml da solução *Stringent Wash Solution*, durante 15 minutos a 45°C com agitação, seguindo-se uma lavagem com agitação com 1 ml da solução de *Rinse* e uma incubação com 1ml da solução de conjugado diluído durante 30 minutos à temperatura ambiente com agitação. Após a incubação, efectuaram-se duas lavagens com 1 ml da solução de *Rinse* e uma lavagem com 1ml de água destilada. De seguida, adicionou-se 1 ml da solução de substrato diluído (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemanha) e incubou-se, entre 3 a 20 minutos, sem agitação e com protecção da luz, até ao aparecimento de sinais de revelação. A reacção de revelação foi interrompida com duas lavagens com água destilada. Os padrões de hibridação foram analisados com a ajuda de uma matriz fornecida pelo fabricante do sistema – Figura 8 (Hain Lifescience, 2009).

3.2.5 GenoType MTBDRsl

O teste GenoType MTBDRsl (Hain Lifescience GmbH) desenvolvido pela Hain Lifescience é baseado na tecnologia “DNA-STRIP®” e permite a identificação simultânea do complexo *M. tuberculosis* e de mutações ligadas à resistência às fluoroquinolonas, como a ofloxacina e a moxifloxacina, aos antibióticos injectáveis (aminoglicosídeos/péptidos cíclicos) e ao etambutol, em

isolados em cultura ou em amostras pulmonares com baciloscopia positiva (Hain Lifescience, 2010). A identificação da resistência às fluoroquinolonas é feita através da detecção das mutações mais frequentes no gene *gyrA*, que codifica para a DNA girase. Para a detecção da resistência aos aminoglicosídeos/péptidos cíclicos, são detectadas as mutações mais comuns no gene que codifica para o 16S RNA (*rrs*) e para a detecção da resistência ao etambutol são detectadas as mutações mais comuns no gene *embB*, que em conjunto com os genes *embA* e *embC*, codifica para arabinosiltransferases (Hain Lifescience, 2010).

O procedimento deste teste envolve a extracção do DNA a partir de culturas de *M. tuberculosis*. De seguida realiza-se uma amplificação por “Multiplex” PCR com “primers” biotinilados, específicos para as regiões dos genes ligados às diferentes resistências. Posteriormente à amplificação, os produtos de PCR são desnaturados e hibridados com tiras de nitrocelulose, contendo sondas para os vários alvos acima referidos. A hibridação com as sondas é revelada através da reacção de pós hibridação, que promove o desenvolvimento de uma reacção colorimétrica no local das sondas com as quais ocorre hibridação, detectável a olho nu. Deste modo, as mutações são detectadas pela ausência de hibridação com uma sonda de uma sequência selvagem ou através da hibridação do fragmento amplificado com uma sonda específica para as mutações mais comuns (Hain Lifescience, 2010).

O teste GenoType MTBDRsl (Figura 10) contém um total de 22 zonas de reacção, sendo elas: controlo do conjugado; controlo de amplificação; uma sonda para o complexo *M. tuberculosis*; uma sonda controlo do gene *gyrA*; três sondas para sequências selvagens do gene *gyrA*; seis sondas para mutações específicas no gene *gyrA*; uma sonda controlo do gene *rrs*; duas sondas para sequências selvagens do gene *rrs*; duas sondas para mutações específicas no gene *rrs*; uma sonda controlo do gene *embB*; uma sonda para uma sequência selvagem do gene *embB* e duas sondas para mutações específicas no gene *embB* (Hain Lifescience, 2010).

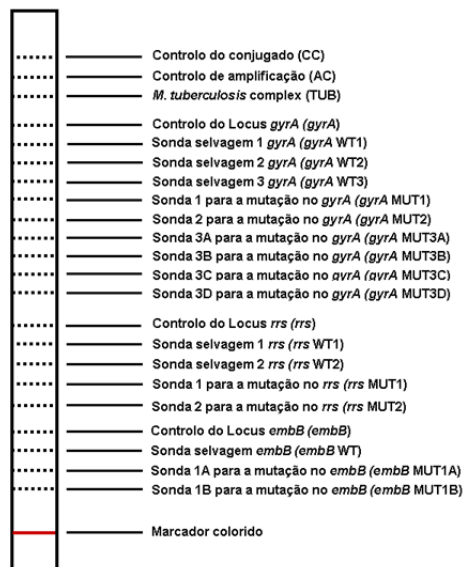


Figura 10. Ilustração da tira do sistema de detecção molecular GenoType MTBDRsl (adaptado de: Hain Lifescience, 2010).

As sondas selvagens para o gene *gyrA* compreendem a região entre os codões 85 a 96 do respectivo gene (Figura 11), com a sonda *gyrA* WT1 a abranger a região entre os codões 85 a 89, a sonda *gyrA* WT2 a região entre os codões 89 a 93 e a sonda *gyrA* WT3 a região entre os condões 92 a 96. No que diz respeito às sondas para as mutações (Figura 11), a sonda *gyrA* MUT1 identifica a mutação A90V no codão 90, a sonda *gyrA* MUT2 identifica a mutação S91P no codão 91, enquanto as sondas *gyrA* MUT3A, *gyrA* MUT3B, *gyrA* MUT3C e *gyrA* MUT3D identificam as mutações D94A, D94N e D94Y (MUT3B) e D94G e D94H no codão 94, respectivamente (Hain Lifescience, 2010).

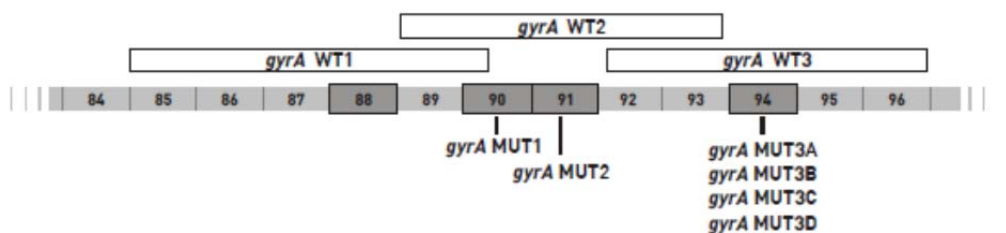


Figura 11. Representação esquemática da região de determinação de resistência às fluoroquinolonas (QRDR de “quinolone-resistance determining region”) no gene *gyrA* e das posições das sondas do sistema MTBDRsl. *gyrA* WT1 a 3: sondas *gyrA* tipo selvagem; *gyrA* MUT 1 a 3: sondas de mutação no *gyrA*. Os números dentro das caixas cinzas mais escuras especificam as posições dos codões para as quais as sondas de mutação foram desenhadas, nomeadamente os codões 90 (A90V), 91 (S91P) e 94 (D94A, D94N, D94Y e D94G e D94H) (adaptado de: Hain Lifescience, 2010).

Para o gene *rrs* existem duas sondas com sequências selvagens, a *rrs* WT1 e a sonda *rrs* WT2, e duas sondas para mutações, a sonda *rrs* MUT1, que identifica a mutação (A→G) no codão 1401 (resistência fenotípica à capreomicina, canamicina e à amicacina) e a sonda *rrs* MUT2, que identifica a mutação (G→T) no codão 1484 (resistência fenotípica à capreomicina, viomicina, canamicina e à amicacina) – Tabela 8 (Hain Lifescience, 2010).

Tabela 8. Sondas selvagens e de mutação do sistema MTBDRsl para o gene *rrs*, com as mutações e a resistência fenotípica correspondentes (adaptado de: Hain Lifescience, 2010).

Sondas selvagens	Nucleótido	Sondas de mutação	Mutação	Resistência fenotípica ⁽¹⁾
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	1401(A→G)	CAP ^R , Vio ^S , AMK ^R , KAN ^R
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	1484(G→T)	CAP ^R , Vio ^R , AMK ^R , KAN ^R

(1) CAP: Capreomicina; Vio: Viomicina; AMK: Amicacina; KAN: Canamicina; R: Resistente; S: Sensível;

Por fim, para o gene *embB* existe apenas uma sonda com sequência selvagem (*embB* WT) e duas sondas para mutações, a *embB* MUT1A, que identifica a mutação M306I e a *embB* MUT1B, que identifica a mutação M306V – Tabela 9 (Hain Lifescience, 2010).

Tabela 9. Sondas selvagens e de mutação do sistema MTBDRsl para o gene *embB*, com as mutações e a resistência fenotípica correspondentes (adaptado de: Hain Lifescience, 2010).

Sondas selvagens	Codões	Sondas de mutação	Mutação	Resistência fenotípica ⁽¹⁾
<i>embB</i> WT	306	<i>embB</i> MUT1A	M306I	EMB ^R
<i>embB</i> WT	306	<i>embB</i> MUT1B	M306V	EMB ^R

(1) EMB: Etambutol; R: Resistente

3.2.5.1 GenoType MTBDRsl - Amplificação

A amplificação foi efectuada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, incluindo a utilização de uma polimerase específica (HotStarTaq DNA Polimerase, da Qiagen) como sugerido. Concisamente, as reacções do “Multiplex” PCR foram preparadas adicionando 5µl de DNA total extraído a uma mistura reaccional de 45µl contendo: 5µl de tampão 10X (contém 15 mM MgCl₂) da enzima HotStarTaq DNA Polimerase (Qiagen); 2µl de solução 25 mM MgCl₂ da enzima HotStarTaq DNA Polimerase (Qiagen), 35µl de “Primer Nucleotid Mix (PNM)” (Hain Lifescience GmbH); 0,2µl (1 U) de HotStarTaq DNA Polimerase (Qiagen) e 3µl de água bidestilada esterilizada por autoclavagem (Hain Lifescience, 2010).

As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador Mastercycler Personal e respeitaram o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C durante 15 minutos, seguida de 10 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos e emparelhamento a 58°C durante 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 25 segundos, emparelhamento a 53°C durante 40 segundos e extensão a 70°C durante 40 segundos, terminando com um passo de extensão final a 70°C durante 8 minutos (Hain Lifescience, 2010).

Os produtos da amplificação foram analisados por electroforese em gel de 2% (p/v) com 0,25 µg/ml de brometo de etídeo, em tampão TAE 1X e com voltagem constante de 65 V durante 45

minutos. Foi utilizado como marcador de peso molecular o GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder. Os resultados foram visualizados e registados num aparelho Gel-doc XR.

3.2.5.2 GenoType MTBDRsl - Hibridação

A hibridação foi efectuada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. Resumidamente, 20µl do produto amplificado foram desnaturados à temperatura ambiente durante 5 minutos com a adição de 20µl da solução de desnaturação (Hain Lifescience GmbH), seguindo-se uma incubação com agitação com 1ml da solução de hibridação a 45°C durante 30 minutos. Após a hibridação, efectuou-se uma lavagem com 1 ml da solução *Stringent Wash Solution*, durante 15 minutos a 45°C com agitação, seguindo-se uma lavagem com agitação com 1 ml da solução de *Rinse* e uma incubação com 1ml da solução de conjugado diluído durante 30 minutos à temperatura ambiente com agitação. Após a incubação, efectuaram-se duas lavagens com 1 ml da solução de *Rinse* e uma lavagem com 1ml de água destilada. De seguida, adicionou-se 1 ml da solução de substrato diluído e incubou-se, entre 3 a 20 minutos, sem agitação e com protecção da luz, até ao aparecimento de sinais de revelação. A reacção de revelação foi interrompida com duas lavagens com água destilada. Os padrões de hibridação foram analisados com a ajuda de uma matriz, fornecida pelo fabricante do sistema – Figura 10 (Hain Lifescience, 2010).

3.2.6 Sequenciação do gene *rpoB*

Para a amplificação de um fragmento interno do gene *rpoB* com cerca de 350 pb, utilizou-se DNA genómico extraído de culturas. Os “primers” utilizados encontram-se descritos na Tabela 3.

As reacções foram preparadas adicionando 5µl de DNA total extraído a uma mistura reaccional de 45µl contendo: 5µl de 1X tampão da enzima Taq DNA Polimerase; 1,75 mM MgCl₂, 200µM de

cada dNTP, 20 pmol de cada “primer”, 2 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas International Inc) e água bidestilada esterilizada por autoclavagem.

As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador Mastercycler Personal com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, emparelhamento a 60°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto, terminando com um passo de extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Os produtos da amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) com 0,25 µg/ml de brometo de etídeo, em tampão TAE 1X e com voltagem constante de 65 V durante 45 minutos, utilizando-se como marcador de peso molecular o GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder e enviados para purificação e sequenciação nas instalações da STAB-VIDA (Caparica, Portugal). Ambas as cadeias de DNA foram sequenciadas, com o par de “primers” usado na amplificação por PCR. As sequências obtidas foram analisadas para rastreio de mutações com recurso aos programas de análise de sequências “BioEdit” versão 7.0.8.0 (Hall, 1998) e “CLC Sequence Viewer” versão 6.4 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca).

3.2.7 Validação analítica dos sistemas de detecção molecular estudados

A validação do desempenho dos três sistemas de detecção molecular utilizados neste trabalho foi realizada recorrendo-se ao cálculo dos seguintes parâmetros segundo Forbes *et al.*, 2002:

- Sensibilidade - percentagem de amostras detectadas com o agente/problema de interesse que têm o resultado do teste positivo. Indica quão bom é o teste a identificar as amostras com agente/problema;
- Especificidade - percentagem de amostras sem o agente/problema de interesse que têm o teste negativo. Indica quão bom é o teste a identificar as amostras sem o agente/problema;

- Valor Preditivo Positivo (VPP) - probabilidade de uma amostra com um resultado positivo ter efectivamente o agente/problema;
- Valor Preditivo Negativo (VPN) - probabilidade de uma amostra com um resultado negativo não ter efectivamente o agente/problema.

Para efectuar os cálculos foi usada uma tabela que contem todas as informações críticas para cada sistema e que permite a fácil aplicação das fórmulas utilizadas - Figura 12 (Forbes *et al.*, 2002).

		“Gold Standard”	
		Positivo	Negativo
Sistema em estudo	Positivo	a verdadeiro positivo	b falso positivo
	Negativo	c falso negativo	d verdadeiro negativo

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{VPP} = \frac{a}{a + b} \times 100$$

$$\text{VPN} = \frac{d}{c + d} \times 100$$

Figura 12. Tabela modelo usada para a validação analítica dos sistemas de detecção molecular estudados e respectivas fórmulas para o cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) (adaptado de: Forbes *et al.*, 2002).

Relativamente aos sistemas de detecção molecular estudados, considera-se:

- Um resultado positivo para a identificação do complexo *M. tuberculosis*, quando é detectada hibridação com a respectiva sonda.
- Um resultado positivo para a detecção de resistência a um determinado antibiótico, quando é detectada a presença de uma mutação para a resistência por hibridação com a sonda correspondente. Desta forma, um “falso positivo” ocorre quando é detectada uma mutação numa estirpe fenotipicamente sensível ao fármaco e um “falso negativo” quando não é detectada mutação numa estirpe fenotipicamente resistente ao fármaco.

4 Resultados

4.1 Detecção de Tuberculose Multirresistente (MDR-TB)

Nesta parte do trabalho, testaram-se e avaliaram-se os sistemas de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus para a identificação de MDR-TB (*M. tuberculosis* resistente à rifampicina e à isoniazida) em isolados clínicos e amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

4.1.1 Isolados Clínicos

Foram analisados os DNAs extraídos de 21 isolados clínicos previamente identificados como pertencendo ao complexo *M. tuberculosis* e cujo perfil fenotípico de resistência aos antibióticos de primeira linha havia sido previamente determinado como sendo multirresistentes (em 20 deles com resistência pelo menos à rifampicina e isoniazida) e ainda um isolado clínico mono-resistente à rifampicina. Usou-se ainda o DNA extraído de culturas da estirpe de referência H37Rv. Para o seu estudo do ponto de vista da detecção molecular de mutações que confirmam resistência a estes fármacos recorreu-se aos sistemas INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus tal como proposto nos objectivos deste trabalho.

4.1.1.1 INNO-LiPA Rif. TB

Os 21 isolados clínicos analisados pelo INNO-LiPA Rif. TB apresentaram, todos eles, amplificação após a realização do “Nested” PCR. A visualização dos produtos das duas reacções de amplificação, por electroforese em gel de agarose, permitiu observar dois produtos de amplificação com tamanhos distintos, nomeadamente, o produto da amplificação inicial com os “outer LiPA primers” que apresenta um fragmento com um peso molecular de aproximadamente 410 pb (por

vezes não visível) e o produto da segunda amplificação com os “inner LiPA primers”, que corresponde a um fragmento com um peso molecular de aproximadamente 260 pb (Figura 13).

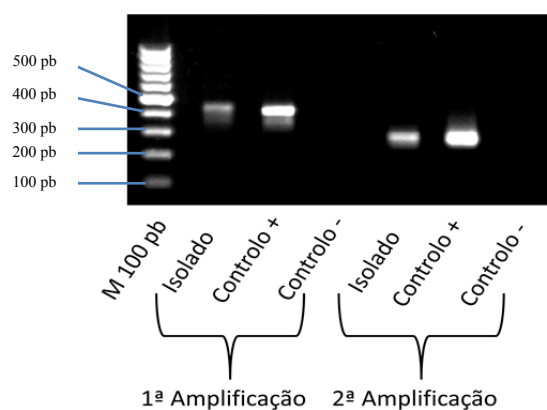


Figura 13. Visualização exemplificativa dos produtos de amplificação por “Nested” PCR do INNO-LiPA Rif. TB, após electroforese em gel de agarose (2%). M 100 pb: marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Produto da 1ª amplificação (“outer LiPA primers”) apresenta uma banda com um peso molecular de aproximadamente 410 pb para o isolado e controlo + (controlo positivo). Produto da 2ª amplificação (“inner LiPA primers”) apresenta uma banda com um peso molecular de aproximadamente 260 pb para o isolado e controlo + (controlo positivo).

No que diz respeito à hibridação, todos isolados clínicos (n=21) apresentaram hibridação com a sonda para o complexo *M. tuberculosis*. Destes, 20 apresentaram hibridação com as sondas de sequências selvagens S1, S2, S3, S4 e a sonda R5 (mutação S531L) e um (isolado 1) apresentou hibridação com as sondas de sequências selvagens S1, S3, S4, S5 e a sonda R2 (mutação D516V) - Figura 14 e Tabela 10.

A estirpe de referência H37Rv apresentou um padrão de hibridação sem mutações (Figura 14 e Tabela 10).

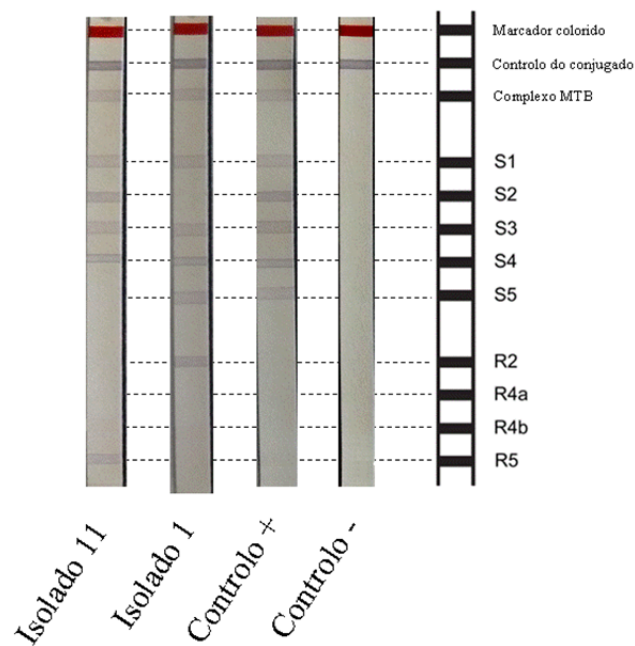


Figura 14. Padrões de hibridação obtidos com o sistema de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB para diferentes isolados. Isolado 11: ausência de hibridação com a sonda S5 e uma banda de hibridação com a sonda R5 (mutação S531L); **Isolado 1:** ausência de hibridação com a sonda S2 e uma banda de hibridação com a sonda R2 (mutação D516V).

4.1.1.2 GenoType MTBDRplus

Os 21 isolados clínicos analisados pelo MTBDRplus apresentaram, todos eles, amplificação total após a realização do “Multiplex” PCR. A visualização dos produtos gerados, por electroforese em gel de agarose a 2%, permitiu observar duas bandas, uma com 110 - 120 pb (correspondendo ao fragmento para identificação do complexo *M. tuberculosis*, ao fragmento da região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* e ao fragmento do gene *katG*) e outra com aproximadamente 166 pb (correspondente ao fragmento do gene *rpoB*) - Figura 15.

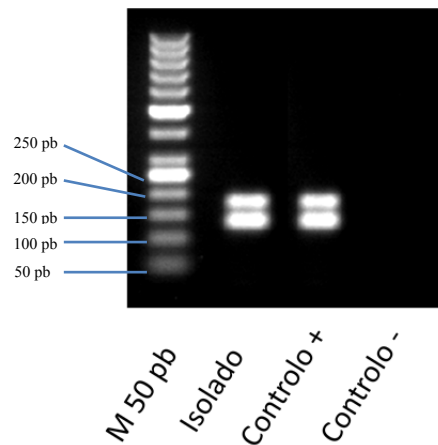


Figura 15. Visualização exemplificativa dos produtos de amplificação por “Multiplex” PCR do MTBDRplus, após electroforese em gel de agarose (2%). M 50 pb: marcador de peso molecular GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder. Isolado e controlo positivo (controlo +) apresentam duas bandas, uma com 110 - 120 pb (correspondente ao fragmento para identificação do complexo *M. tuberculosis*, fragmento da região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* e fragmento do gene *katG*) e uma banda com aproximadamente 166 pb (correspondente ao fragmento do gene *rpoB*).

No que diz respeito à hibridação, dos 21 isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis* analisados por este sistema, 18 apresentaram hibridação com a sonda para o complexo *M. tuberculosis*, a sonda MUT3 do gene *rpoB* (mutação S531L) e a sonda MUT1 na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* (mutação C-15T). Um isolado clínico (Isolado 1) apresentou hibridação com a sonda para o complexo *M. tuberculosis*, a sonda MUT1 do gene *rpoB* (mutação D516V) e a sonda MUT1 na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* (mutação C-15T). Um isolado clínico (Isolado 11) apresentou hibridação com a sonda para o complexo *M. tuberculosis*, a sonda MUT3 do gene *rpoB* (mutação S531L) e a sonda MUT1 do gene *katG* (mutação S315T). Por último, um isolado clínico (Isolado 2) apresentou hibridação com a sonda para o complexo *M. tuberculosis* e a sonda MUT3 do gene *rpoB* (mutação S531L) - Figura 16 e Tabela 10.

Por fim, a estirpe de referência H37Rv apresentou um padrão de hibridação sem mutações (Figura 16 e Tabela 10).

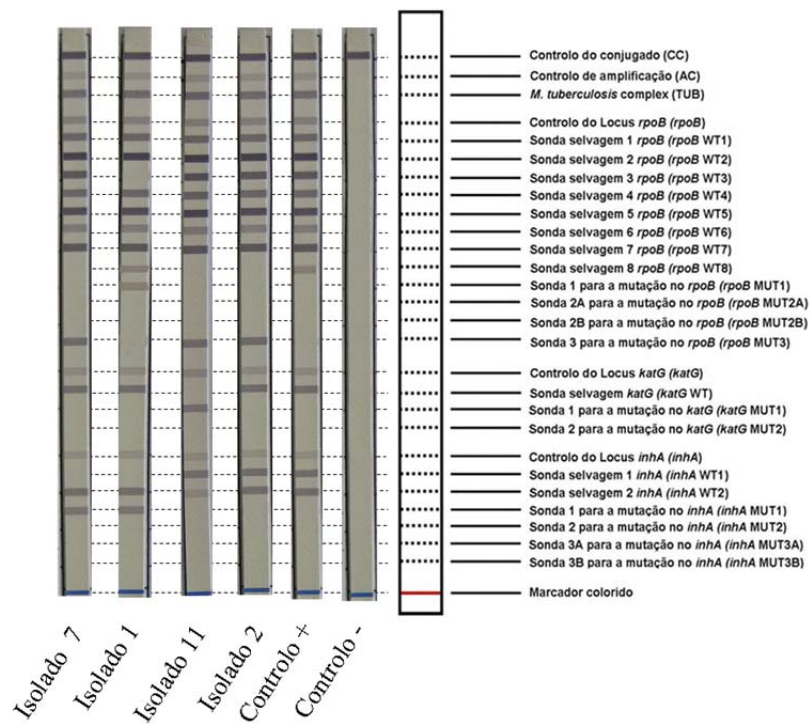


Figura 16. Padrões de hibridação obtidos com o sistema de detecção molecular MTBDRplus para diferentes isolados. Isolado 7: mutação S531L (MUT3) no gene *rpoB* e a mutação C-15T (MUT1) na região promotora do gene *inhA*; **Isolado 1:** mutação D516V (MUT31) no gene *rpoB* e a mutação C-15T (MUT1) na região promotora do gene *inhA*; **Isolado 11:** mutação S531L (MUT3) no gene *rpoB* e a mutação S315T (MUT1) no gene *katG*; **Isolado 2:** mutação S531L (MUT3) no gene *rpoB*.

Tabela 10. Resumo dos resultados dos sistemas de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus na identificação de MDR-TB em isolados clínicos.

Nº do isolado	Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por AccuProbe ⁽¹⁾	Método convencional de susceptibilidade em cultura ⁽²⁾	INNO-LiPA Rif TB ⁽³⁾	MTBDRplus ⁽⁴⁾
1	Positiva	INH ^R , RIF ^R , STR ^R , EMB ^S , PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : D516V	MTBc + <i>rpoB</i> : D516V <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
2	Positiva	INH ^S , RIF ^R , STR ^S , EMB ^S , PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
3	Positiva	INH ^R , RIF ^R , STR ^R , EMB ^R , PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
4	Positiva	INH ^R , RIF ^R , STR ^S , EMB ^R , PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
5	Positiva	INH ^R , RIF ^R , STR ^R , EMB ^R , PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
6	Positiva	INH ^R , RIF ^R , STR ^R , EMB ^R , PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
7	Positiva	INH ^R , RIF ^R , STR ^R , EMB ^R , PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
8	Positiva	INH ^R , RIF ^R , STR ^R , EMB ^S , PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
9	Positiva	INH ^R , RIF ^R , STR ^R , EMB ^R , PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
10	Positiva	INH ^R , RIF ^R , STR ^R , EMB ^R , PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
11	Positiva	INH ^R , RIF ^R , STR ^R , EMB ^R , PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : S315T <i>inhA</i> : WT
H37Rv	Positiva	INH ^S , RIF ^S , STR ^S , EMB ^S , PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT

(1) Gen-Probe Incorporated; (2) S: Sensível; R: Resistente; INH: Isoniazida; RIF: Rifampicina; STR: Estreptomina; EMB: Etambutol; PZA: Pirazinamida; (3;4) MTBc +: Positiva para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; MTBc -: Negativa para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; WT: Selvagem; S: serina; L: leucina; T: treonina;

Tabela 10. Resumo dos resultados dos sistemas de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus na identificação de MDR-TB em isolados clínicos, continuação.

Nº do isolado	Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por AccuProbe ⁽¹⁾	Método convencional de susceptibilidade em cultura ⁽²⁾	INNO-LiPA Rif TB ⁽³⁾	MTBDRplus ⁽⁴⁾
12	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
13	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^S ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
14	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
15	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
16	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
17	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
18	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
19	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
20	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T
21	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L	MTBc + <i>rpoB</i> : S531L <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : C-15T

(1) Gen-Probe Incorporated; (2) S: Sensível; R: Resistente; INH: Isoniazida; RIF: Rifampicina; STR: Estreptomina; EMB: Etambutol; PZA: Pirazinamida; (3;4) MTBc +: Positiva para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; MTBc -: Negativa para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; WT: Selvagem; S: serina; L: leucina; T: treonina;

4.1.2 Amostras Clínicas

Foram analisadas 33 amostras respiratórias com baciloscopia positiva pelo sistema INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus.

4.1.2.1 INNO-LiPA Rif. TB

Das 33 amostras respiratórias com baciloscopia positiva caracterizadas pelo INNO-LiPA Rif. TB, 32 apresentaram amplificação após a realização do “Nested” PCR directamente a partir da amostra (Tabela 11).

Das 32 amostras que foi possível amplificar com o INNO-LiPA Rif. TB, 31 deram um resultado positivo para a detecção do complexo *M. tuberculosis* após a realização da hibridação e uma (amostra 7) não hibridou com a sonda do complexo *M. tuberculosis*. Esta amostra apresentou amplificação no “Nested” PCR efectuada directamente a partir da amostra (Figura 17), no entanto, na hibridação observou-se apenas presença de uma banda de hibridação com a sonda S2 (Figura 18 e Tabela 11). Da posterior identificação deste isolado concluiu-se tratar de *Mycobacterium avium* (vide pag. 63).

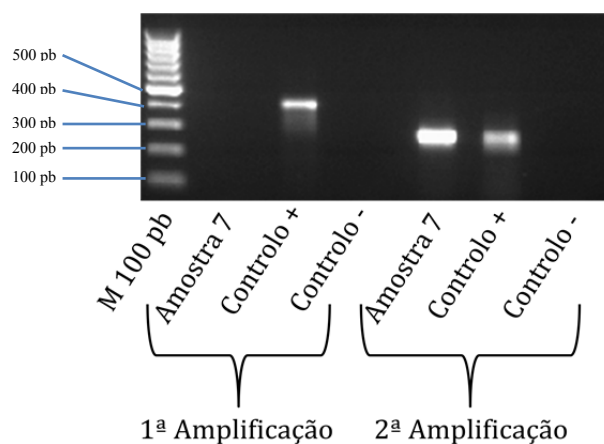


Figura 17. Visualização dos produtos de amplificação do “Nested” PCR do INNO-LiPA Rif. TB para a amostra 7, após electroforese em gel de agarose (2%). M 100 pb: marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Produto da 1ª amplificação (“outer LiPA primers”) apresenta uma banda individual com um peso molecular de aproximadamente 410 pb apenas no controlo positivo (controlo +). Produto da 2ª amplificação (“inner LiPA primers”) apresenta uma banda individual com um peso molecular de aproximadamente 260 pb na amostra e no controlo positivo (controlo +).

Das 31 amostras positivas para o complexo *M. tuberculosis*, 29 apresentaram um padrão de hibridação sem qualquer mutação e duas amostras (Amostra 3 e 26) apresentaram um padrão de hibridação com mutação no gene *rpoB* (Figura 18 e Tabela 11).

A amostra 3 apresentou um padrão de hibridação variável, isto é, da primeira vez que se efectuou o ensaio, esta amostra apresentou uma banda de hibridação de intensidade fraca com a sonda S2 e a ausência de hibridação com a sonda S1, enquanto que na repetição do ensaio para esta amostra, se observou uma banda de hibridação de intensidade muito fraca com a sonda S1 (Figura 18 e Tabela 11). A estirpe isolada deste doente demonstrou ser fenotipicamente susceptível à rifampicina tendo-se procedido à subsequente análise por sequenciação do gene *rpoB* para esclarecimento destes resultados (ver ponto 4.1.2.3).

No caso da amostra 26, observou-se hibridação com a sonda de mutação R4b, correspondente à mutação H526D (Figura 18 e Tabela 11). A estirpe isolada deste doente demonstrou ser fenotipicamente resistente à rifampicina.

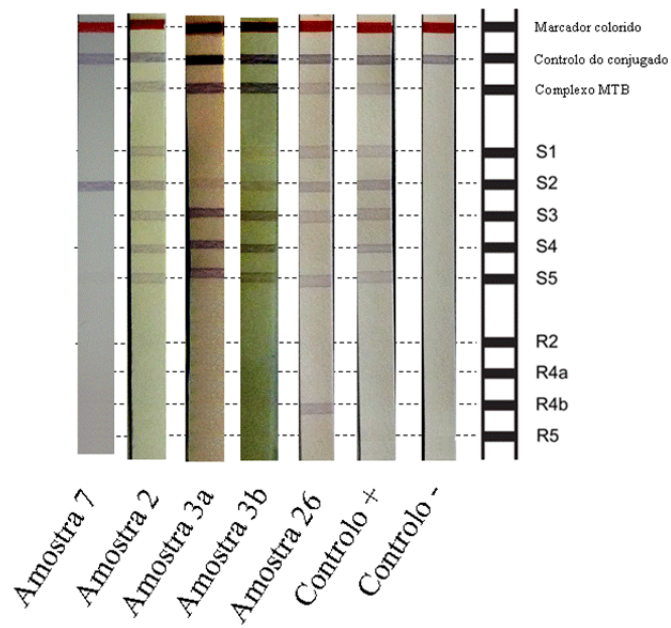


Figura 18. Padrões de hibridação obtidos com o sistema de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB para diferentes amostras. Amostra 7: hibridação com a sonda S2; **Amostra 2:** sem mutações; **Amostra 3a (1ª hibridação):** banda de hibridação de intensidade fraca com a sonda S2 e a ausência de hibridação com a sonda S1; **Amostra 3b (2ª hibridação):** banda de hibridação de intensidade muito fraca com a sonda S1; **Amostra 26:** mutação H526D (R4b) no gene *rpoB*.

4.1.2.2 GenoType MTBDRplus

Das 33 amostras respiratórias caracterizadas pelo MTBDRplus, 27 apresentaram amplificação total após a realização do “Multiplex” PCR directamente a partir das amostras (duas banda visíveis no gel), quatro apresentaram amplificação incompleta (uma banda visível no gel) e duas não apresentaram amplificação (Figura 19 e Tabela 11).

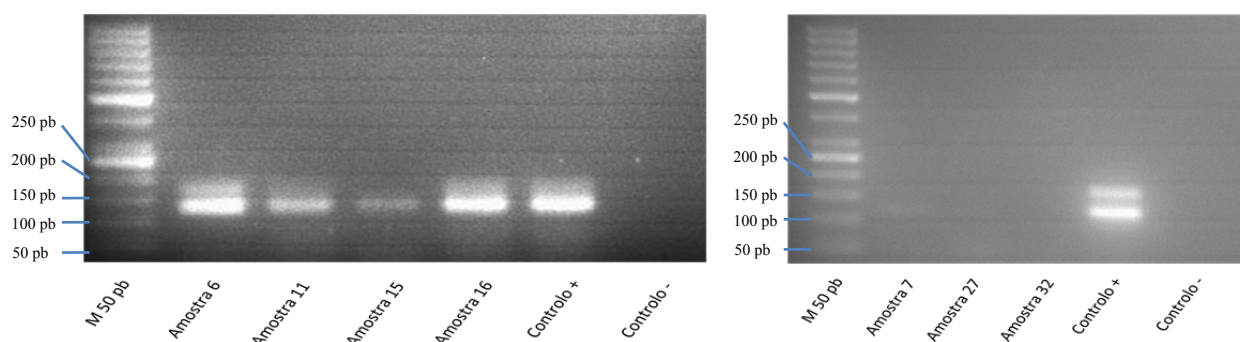


Figura 19. Visualização dos produtos de amplificação por “Multiplex” PCR do MTBDRplus, após electroforese em gel de agarose (2%), para diferentes amostras. M 50 pb: marcador de peso molecular GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; **Amostra 6, 11 e 16:** apresentam duas bandas, uma com 110 - 120 pb (correspondente ao fragmento para identificação do complexo *M. tuberculosis*, ao fragmento da região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* e ao fragmento do gene *katG*) e outra com aproximadamente 166 pb (correspondente ao fragmento do gene *rpoB*); **Amostra 15:** apresenta uma banda com 110 - 120 pb (correspondente ao fragmento para identificação do complexo *M. tuberculosis*, ao fragmento da região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* e ao fragmento do gene *katG*); **Amostra 7:** apresenta uma banda com 110 - 120 pb de intensidade muito fraca (correspondente ao fragmento para identificação do complexo *M. tuberculosis*, ao fragmento da região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* e ao fragmento do gene *katG*); **Amostra 27 e 32** não apresentam bandas de amplificação; **Controlo + (Controlo positivo):** apresentam duas bandas, uma com 110 - 120 pb e outra com aproximadamente 166 pb.

Nas duas amostras que não apresentaram amplificação (amostras 27 e 32), não foi visível qualquer produto de amplificação na electroforese em gel de agarose (Figura 19).

Nas quatro amostras respiratórias que apresentaram amplificação incompleta (amostras 3, 7, 15 e 26), a visualização dos produtos de amplificação gerados por “Multiplex” PCR, apenas permitiu observar uma das duas bandas esperadas, nomeadamente, a banda com cerca de 110 - 120 pb, correspondente ao fragmento para identificação do complexo *M. tuberculosis*, ao fragmento da região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* e ao fragmento do gene *katG*. A banda com

aproximadamente 166 pb, correspondente ao fragmento do gene *rpoB*, não estava visível (Figura 19), pelo que, destas quatro amostras apenas se efectuou a hibridação das amostras 7 e 15. A amostra 7 apresentou hibridação apenas com as sondas para a região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA*, nomeadamente com a sonda de controlo do gene e com as sondas de sequências selvagens, e a amostra 15 apresentou hibridação apenas com as sondas para o gene *katG*, nomeadamente com a sonda de controlo do gene e com a sonda de sequência selvagem (Figura 20 e Tabela 11). Estes resultados inconclusivos foram posteriormente analisados em comparação como os resultados fenotípicos e genotípicos obtidos com outros métodos e a sua discussão encontra-se no ponto 5.1.2.2.

Nas 27 amostras que apresentaram amplificação total com o MTBDRplus, após a realização da hibridação, observou-se que todas apresentaram hibridação com a sonda para o complexo *M. tuberculosis* e todas apresentaram um padrão de hibridação sem mutações nos genes *rpoB*, *katG* e na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* (Figura 20 e Tabela 11). Contudo, duas amostras (amostras 11 e 17) apresentaram uma banda de hibridação de intensidade fraca com a sonda de controlo do gene e com a sonda de sequência selvagem 2 (*inhA* WT2) da região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* (Figura 20).

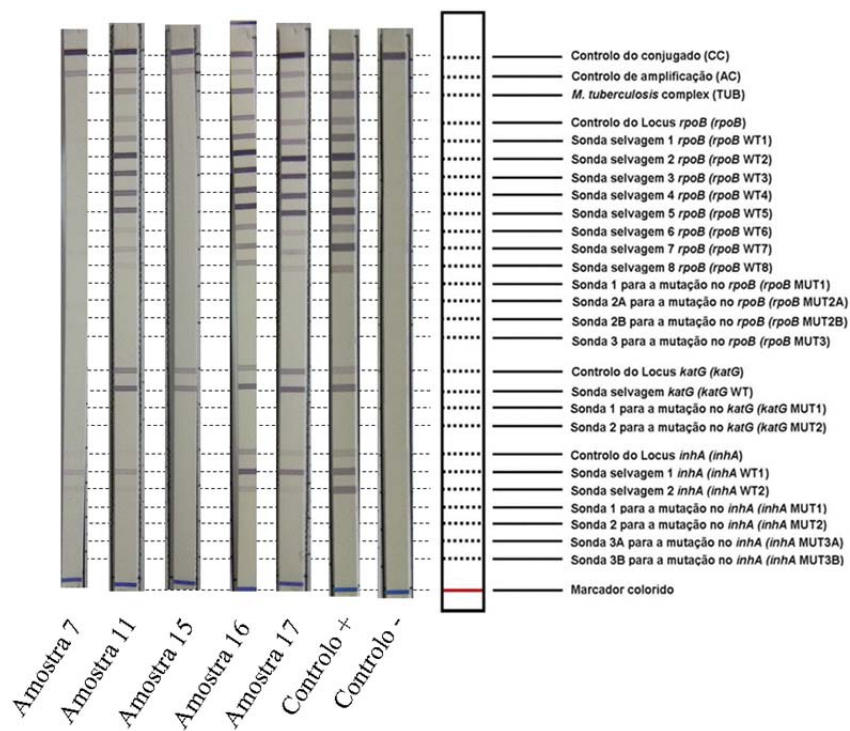


Figura 20. Padrões de hibridação obtidos com o sistema de detecção molecular MTBDRplus para diferentes amostras. Amostra 7: bandas de hibridação de intensidade fraca com a sonda de controlo do gene e com as sondas de sequências selvagens da região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA*; **Amostra 11:** bandas de hibridação de intensidade fraca com a sonda de controlo do gene e com a sonda de sequência selvagem 2 (*inhA* WT2), da região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA*; **Amostra 15:** hibridação apenas com a sonda de controlo do gene e com a sonda de sequência selvagem do gene *katG*; **Amostra 16:** sem mutações; **Amostra 17:** bandas de hibridação de intensidade fraca com a sonda de controlo do gene e com a sonda de sequência selvagem 2 (*inhA* WT2), da região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA*.

Tabela 11. Resumo dos resultados dos sistemas de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus na identificação de MDR-TB em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

Nº da amostra	Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por AccuProbe ⁽¹⁾	Método convencional de susceptibilidade em cultura ⁽²⁾	INNO-LiPA Rif TB ⁽³⁾	MTBDRplus ⁽⁴⁾
H37Rv	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
1	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
2	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
3	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : S1 -	Amplificação incompleta
4	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
5	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
6	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
7	Negativa ⁽⁵⁾	-	MTBc -	Amplificação incompleta MTBc s/h <i>rpoB</i> : s/h <i>katG</i> : s/h <i>inhA</i> : WT
8	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
9	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
10	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
11	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT

(1) Gen-Probe Incorporated; (2) S: Sensível; R: Resistente; INH: Isoniazida; RIF: Rifampicina; STR: Estreptomicina; EMB: Etambutol; PZA: Pirazinamida. (3;4) MTBc +: Positiva para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; MTBc -: Negativa para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; WT: Selvagem; s/h: sem bandas de hibridação; D: ácido aspártico; H: histidina. (5) *Mycobacterium avium*. (6) *Mycobacterium intracellulare*.

Tabela 11. Resumo dos resultados dos sistemas de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus na identificação de MDR-TB em amostras respiratórias com baciloscopia positiva, continuação.

Nº da amostra	Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por AccuProbe ⁽¹⁾	Método convencional de susceptibilidade em cultura ⁽²⁾	INNO-LiPA Rif TB ⁽³⁾	MTBDRplus ⁽⁴⁾
12	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
13	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
14	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
15	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	Amplificação incompleta MTBc s/h <i>rpoB</i> : s/h <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : s/h
16	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
17	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
18	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
19	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
20	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
21	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
22	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
23	Positiva	INH ^R ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT

(1) Gen-Probe Incorporated; (2) **S**: Sensível; **R**: Resistente; **INH**: Isoniazida; **RIF**: Rifampicina; **STR**: Estreptomina; **EMB**: Etambutol; **PZA**: Pirazinamida; (3;4) **MTBc +**: Positiva para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; **MTBc -**: Negativa para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; **WT**: Selvagem; **s/h**: sem bandas de hibridação; **D**: ácido aspártico; **H**: histidina. (5) *Mycobacterium avium*. (6) *Mycobacterium intracellulare*.

Tabela 11. Resumo dos resultados dos sistemas de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus na identificação de MDR-TB em amostras respiratórias com baciloscopia positiva, continuação.

Nº da amostra	Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por AccuProbe ⁽¹⁾	Método convencional de susceptibilidade em cultura ⁽²⁾	INNO-LiPA Rif TB ⁽³⁾	MTBDRplus ⁽⁴⁾
24	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
25	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^R	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
26	Positiva	INH ^S ; RIF ^R ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : H526D	Amplificação incompleta
27	Negativa ⁽⁶⁾	-	Não amplificou	Não amplificou
28	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
29	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
30	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
31	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT
32	Positiva	INH ^R ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	Não amplificou
33	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT

(1) Gen-Probe Incorporated; (2) **S**: Sensível; **R**: Resistente; **INH**: Isoniazida; **RIF**: Rifampicina; **STR**: Estreptomicina; **EMB**: Etambutol; **PZA**: Pirazinamida; (3;4) **MTBc +**: Positiva para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; **MTBc -**: Negativa para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; **WT**: Selvagem; **s/h**: sem bandas de hibridação; **D**: ácido aspártico; **H**: histidina. (5) *Mycobacterium avium*. (6) *Mycobacterium intracellulare*.

4.1.2.3 Sequenciação do gene *rpoB* para a amostra com resultados inconclusivos no INNO-

LiPA Rif. TB

Para a amostra que apresentou um padrão de hibridação variável com as sondas *rpoB* no ensaio de INNO-LiPA Rif. TB, amostra 3, sequenciou-se um fragmento do gene *rpoB*, utilizando os “primers” descritos na Tabela 3 (Capítulo Materiais e Métodos). Após a recepção da sua sequência e a subsequente análise observou-se a presença de uma mutação no codão 514, correspondendo à substituição do nucleótido C na posição 1299 pelo nucleótido T (codão TTC pelo TTT na posição 514) – Figura 21.

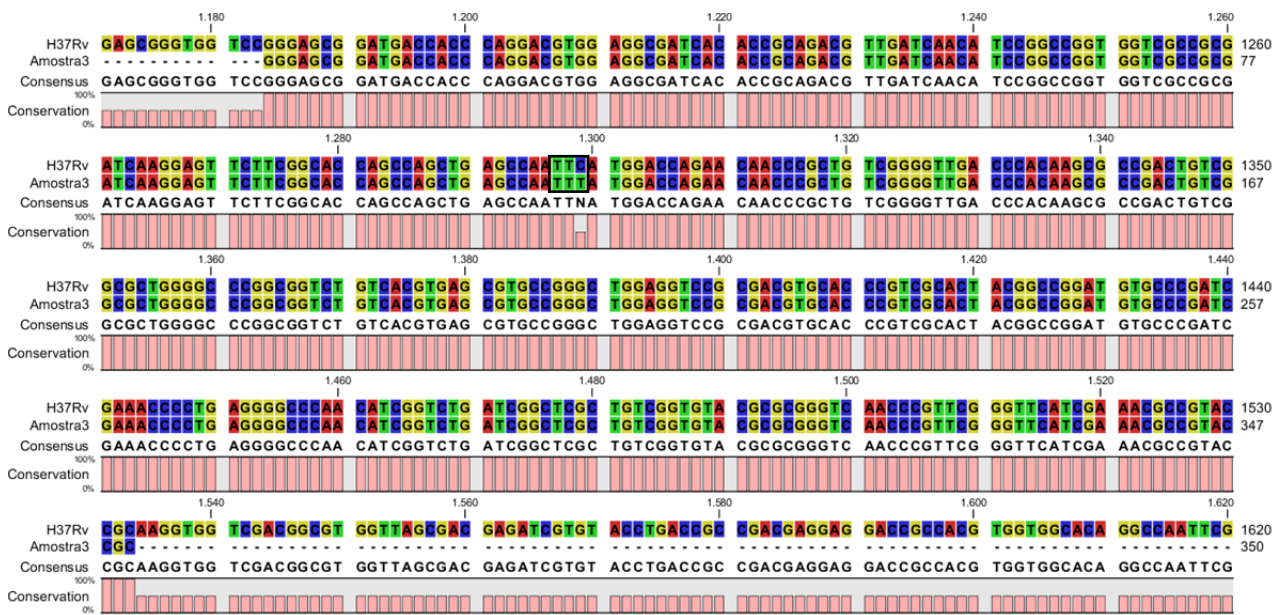


Figura 21. Alinhamento do resultado de sequenciação da amostra 3 com a estirpe de referência H37Rv, efectuado com o recurso ao programa “CLC Sequence Viewer” versão 6.4 (CLC bio). Os números em cima das sequências indicam a posição dos nucleótidos com base na sequência do gene *rpoB* da estirpe de referência H37Rv; Na linha de cima encontra-se a sequência do gene *rpoB* da estirpe H37Rv; na linha de baixo a sequência amplificada do gene *rpoB* da amostra 3; As barras rosas indicam a conservação das duas sequências; A sequência a preto indica a sequência consenso; O quadrado preto indica o codão 514, localizado entre os nucleótidos 1297 e 1299 do gene *rpoB*. A numeração dos aminoácidos é relativa ao sistema de numeração de *Escherichia coli*.

4.2 Detecção de Tuberculose Extensivamente Resistente (XDR-TB)

Conforme explicitado nos Objectivos desta Dissertação, procurou-se igualmente testar a proficiência dos novos testes moleculares para a detecção de XDR-TB através da aplicação do sistema de detecção molecular MTBDRsl aos 21 isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis* anteriormente caracterizados e à estirpe de referência H37Rv.

4.2.1 GenoType MTBDRsl

Os 21 isolados clínicos analisados pelo MTBDRsl apresentaram, todos eles, amplificação total após a realização do “Multiplex” PCR. A visualização dos produtos de amplificação por electroforese em gel de agarose permitiu observar duas bandas, uma com 110 - 140 pb (correspondendo ao fragmento para identificação do complexo *M. tuberculosis*, ao fragmento do gene *gyrA* e ao fragmento do gene *embB*) e outra com aproximadamente 260 pb (correspondendo ao fragmento do gene *rrs*) (Figura 22).

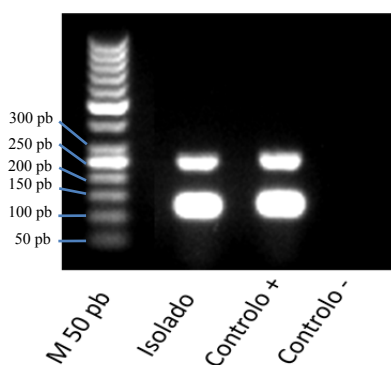


Figura 22. Visualização exemplificativa dos produtos de amplificação por “Multiplex” PCR do MTBDRsl, após electroforese em gel de agarose (2%). M 50 pb: marcador de peso molecular GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder. Isolado e controlo positivo (controlo +) apresentam duas bandas, uma com 110 - 140 pb (correspondendo ao fragmento para identificação do complexo *M. tuberculosis*, ao fragmento do gene *gyrA* e ao fragmento do gene *embB*) e outra com aproximadamente 260 pb (correspondendo ao fragmento do gene *rrs*).

No que diz respeito à hibridação, dos 21 isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis* analisados por este ensaio, todos apresentaram hibridação com a sonda para o complexo *M. tuberculosis*. Seis isolados apresentam um padrão de hibridação sem mutações nos genes *gyrA*, *rrs* e *embB*. Três isolados apresentaram hibridação com a sonda MUT1B do gene *embB*, correspondente à mutação M306V. Outros seis isolados apresentaram hibridação com a sonda MUT2 do gene *gyrA*, correspondente à mutação S91P, enquanto um isolado (isolado 9) apresentou hibridação com a sonda MUT3C do gene *gyrA*, correspondente à mutação D94G. Dois isolados apresentaram hibridação com a sonda MUT3C do gene *gyrA* (mutação D94G) e a sonda MUT1B do gene *embB* (mutação M306V). Por fim, os três isolados restantes apresentaram hibridação com a sonda MUT3A do gene *gyrA* (mutação D94A), a sonda MUT1B do gene *embB* (mutação M306V) e a sonda MUT1 do gene *rrs* (mutação A1401G) (Figura 23 e Tabela 12). Estes resultados de detecção molecular foram confrontados com os resultados fenotípicos (vide 5.2.1) para o antibiótico etambutol para o qual existe um teste de susceptibilidade fenotípico validado a nível internacional e considerado como “gold-standard”. Para o grupo das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos/péptidos cíclicos, optou-se por não efectuar qualquer análise fenotípica das estirpes estudadas, uma vez que esta caracterização está atribuída aos laboratórios de referência nacionais (Direcção Geral da Saúde, 2007), não estando implementado em rotina no nosso laboratório.

Por fim, a estirpe de referência H37Rv apresentou um padrão de hibridação sem mutações (Figura 23 e Tabela 12).

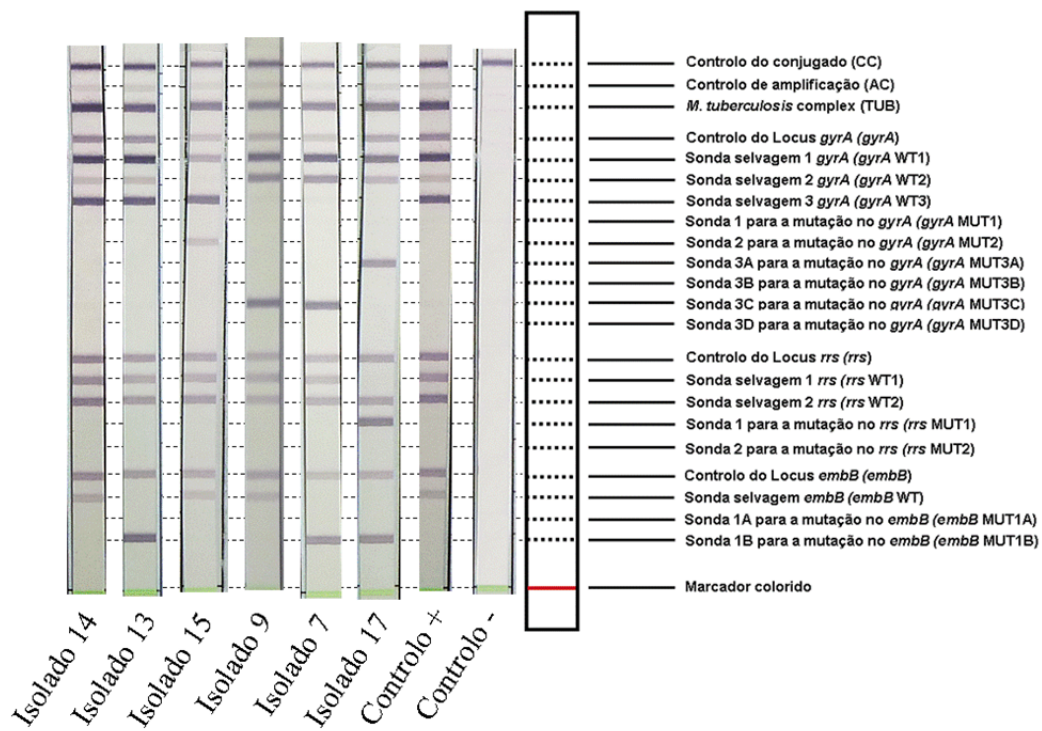


Figura 23. Padrões de hibridação obtidos com o sistema de detecção molecular MTBDRsl para diferentes isolados. Isolado 14: sem mutações; **Isolado 13:** mutação M306V (MUT1B) no *embB*; **Isolado 15:** mutação S91P (MUT2) no gene *gyrA*; **Isolado 9:** mutação D94G (MUT3C) no gene *gyrA*; **Isolado 7:** mutação D94G (MUT3C) no gene *gyrA* e a mutação M306V (MUT1B) no *embB*; **Isolado 17:** mutação D94A (MUT3A) no gene *gyrA*, a mutação A1401G (MUT1) no gene *rrs* e a mutação M306V (MUT1B) no *embB*.

Tabela 12. Resumo dos resultados do sistema de detecção molecular MTBDRsl na identificação de XDR-TB em isolados clínicos.

Nº do isolado	Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por AccuProbe ⁽¹⁾	Método convencional de susceptibilidade em cultura ⁽²⁾	MTBDRsl ⁽³⁾
1	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : WT <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
2	Positiva	INH ^S ; RIF ^R ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>gyrA</i> : WT <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
3	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : D94A <i>rrs</i> : 1401(A→G) <i>embB</i> : M306V
4	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^S ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : WT <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : M306V
5	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : D94G <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : M306V
6	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^S	MTBc + <i>gyrA</i> : WT <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
7	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : D94G <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : M306V
8	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>gyrA</i> : WT <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
9	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^S	MTBc + <i>gyrA</i> : D94G <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
10	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : S91P <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
H37Rv	Positiva	INH ^S ; RIF ^S ; STR ^S ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>rpoB</i> : WT <i>katG</i> : WT <i>inhA</i> : WT

(1) Gen-Probe Incorporated; (2) **S**: Sensível; **R**: Resistente; **INH**: Isoniazida; **RIF**: Rifampicina; **STR**: Estreptomina; **EMB**: Etambutol; **PZA**: Pirazinamida; (3) **MTBc +**: Positiva para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; **MTBc -**: Negativa para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; **WT**: Selvagem; **S**: serina; **D**: ácido aspártico; **A**: alanina; **G**: glicina; **M**: metionina; **V**: valina; **P**: prolina;

Tabela 12. Resumo dos resultados do sistema de detecção molecular MTBDRsl na identificação de XDR-TB em isolados clínicos, continuação.

Nº do isolado	Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> por AccuProbe ⁽¹⁾	Método convencional de susceptibilidade em cultura ⁽²⁾	MTBDRsl ⁽³⁾
11	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : WT <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
12	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : S91P <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
13	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^S ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : WT <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : M306V
14	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>gyrA</i> : WT <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
15	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>gyrA</i> : S91P <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
16	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : D94A <i>rrs</i> : 1401(A→G) <i>embB</i> : M306V
17	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^R ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : D94A <i>rrs</i> : 1401(A→G) <i>embB</i> : M306V
18	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : WT <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : M306V
19	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^R	MTBc + <i>gyrA</i> : S91P <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
20	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>gyrA</i> : S91P <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT
21	Positiva	INH ^R ; RIF ^R ; STR ^R ; EMB ^S ; PZA ^S	MTBc + <i>gyrA</i> : S91P <i>rrs</i> : WT <i>embB</i> : WT

(1) Gen-Probe Incorporated; (2) **S**: Sensível; **R**: Resistente; **INH**: Isoniazida; **RIF**: Rifampicina; **STR**: Estreptomina; **EMB**: Etambutol; **PZA**: Pirazinamida; (3) **MTBc +**: Positiva para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; **MTBc -**: Negativa para complexo *Mycobacterium tuberculosis*; **WT**: Selvagem; **S**: serina; **D**: ácido aspártico; **A**: alanina; **G**: glicina; **M**: metionina; **V**: valina; **P**: prolina;

5 Discussão

Em termos gerais, pode-se considerar que os testes baseados na amplificação e hibridação de ácidos nucleicos são precisos e úteis para a detecção rápida de mutações ligadas à resistências aos antibacilares em isolados clínicos ou em amostras com baciloscopia positiva, permitindo uma interpretação fácil dos resultados, sendo de utilização acessível em rotina e apresentando, no geral, alta especificidade e sensibilidade para a detecção das mutações. Contudo, tal como todos os ensaios moleculares de detecção de mutações que conferem resistência aos antibióticos, apresentam algumas limitações: o número de genes analisados permanece limitado; falham na detecção de mutações localizadas fora dos *loci* alvo; podem detectar mutações silenciosas, não relacionadas com a resistência e podem ainda falhar na detecção de subpopulações com resistências emergentes dentro de uma população mista de bactérias. Neste sentido, a confirmação dos seus resultados, através da realização dos testes tradicionais de susceptibilidade fenotípica, é essencial. Além disso, os três sistemas de detecção molecular estudados neste trabalho necessitam de pessoal dedicado, com conhecimentos técnicos e teóricos específicos, bem como de equipamentos e infra-estruturas adequadas ao seu uso, apresentando ainda um custo elevado (Morgan *et al.*, 2005; Viveiros *et al.*, 2005; Traore *et al.*, 2006; Benerjee *et al.*, 2008; Hillemann *et al.*, 2008; Migliori *et al.*, 2008; Brossier *et al.*, 2010; Kiet *et al.*, 2010).

5.1 Detecção de Tuberculose Multirresistente (MDR-TB)

Visto que um dos objectivos do nosso trabalho é a identificação rápida de MDR-TB, na primeira etapa deste estudo aferimos a proficiência dos sistemas de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB e GenoType MTBDRplus na identificação do complexo *M. tuberculosis* e na detecção da resistência aos principais fármacos de primeira linha. Neste sentido, foram seleccionados 21 isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis*, provenientes da colecção de culturas do laboratório

de Micobactérias do IHMT, UNL, dos quais 20 são multirresistentes e um é mono resistente à rifampicina, de acordo com os resultados dos testes de susceptibilidade fenotípica.

Na etapa seguinte do trabalho pretendeu-se testar os dois sistemas em 33 amostras respiratórias com baciloscopia positiva, com o propósito de identificar a sensibilidade e especificidade de cada sistema quando usado directamente em amostras respiratórias, bem como, enquadrar a utilidade destes dois sistemas no algoritmo de trabalho em uso no laboratório de Micobactérias do IHMT, UNL.

5.1.1 Isolados clínicos

5.1.1.1 INNO-LiPA Rif. TB

A aplicação do INNO-LiPA Rif. TB na caracterização dos 21 isolados clínicos e na caracterização da estirpe de referência H37Rv, permitiu identificar todos como pertencendo ao complexo *M. tuberculosis* (Tabela 10). Ao compararmos estes resultados com os resultados obtidos pelo método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe, constatamos que o INNO-LiPA Rif. TB identificou correctamente o complexo *M. tuberculosis* nos 21 isolados clínicos, pelo que, não houve resultados divergentes entre os resultados do INNO-LiPA Rif. TB e os resultados do método considerado “gold standard” na identificação do complexo *M. tuberculosis* - Tabela 13 (Truant, 2002).

Tabela 13. Correlação entre o sistema INNO-LiPA Rif. TB e o método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe, na identificação do complexo *M. tuberculosis* em isolados clínicos.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Positivo	Negativo	
INNO-LiPA Rif. TB	Positivo	21	0	21
	Negativo	0	0	0
Total		21	0	21

(1) Método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe (Gen-Probe Incorporated).

Deste modo, neste trabalho e para a amostra em estudo, o sistema de detecção molecular INNO-LiPA Rif. TB apresenta um valor de sensibilidade de 100% no que diz respeito à identificação do complexo *M. tuberculosis* em isolados clínicos (Tabela 14). Uma vez que não foi analisada uma amostra significativa de isolados que não *M. tuberculosis*, não é possível calcular a especificidade e o valor preditivo negativo para a identificação molecular de *M. tuberculosis*.

Tabela 14. Sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema INNO-LiPA Rif. TB na identificação do complexo *M. tuberculosis* em isolados clínicos.

INNO-LiPA Rif. TB	Sensibilidade	Valor preditivo positivo
Identificação do complexo	100%	100%

No que se refere à detecção de mutações ligadas à resistência à rifampicina, o INNO-LiPA Rif. TB detectou mutações no gene *rpoB* dos 21 isolados clínicos estudados e a ausência de mutações no gene *rpoB* na estirpe de referência H37Rv (Tabela 10). Confrontando estes resultados com os resultados do método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960 TB), verificamos que este sistema detectou correctamente mutações que conduzem à resistência à

rifampicina nos 21 isolados clínicos estudados. Assim, não houve discordâncias entre os resultados *M. tuberculosis* do INNO-LiPA Rif. TB e os resultados do método considerado “gold standard” na detecção da resistência à rifampicina (Tabela 15).

Tabela 15. Correlação entre o sistema INNO-LiPA Rif. TB e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis*.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Resistente	Susceptível	
INNO-LiPA Rif. TB	Resistente ⁽²⁾	21	0	21
	Susceptível ⁽³⁾	0	0	0
Total		21	0	21

(1) Método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson); (2) com mutações que conferem resistência à rifampicina; (3) sem mutações que conferem resistência à rifampicina.

Desta forma, neste trabalho, o INNO-LiPA Rif. TB apresenta um valor de sensibilidade de 100% para a detecção de mutações ligadas à resistência à rifampicina em isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis* (Tabela 16). Uma vez que neste estudo apenas foi incluída uma amostra de *M. tuberculosis* totalmente susceptível aos antibióticos (*M. tuberculosis* H37Rv), optou-se por não apresentar a especificidade e o valor preditivo negativo para a detecção de mutações ligadas à resistência à rifampicina para isolados de *M. tuberculosis*.

Tabela 16. Sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema INNO-LiPA Rif. TB na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis*.

INNO-LiPA Rif. TB	Sensibilidade	Valor preditivo positivo
Detecção de mutações que conferem à resistência à Rifampicina	100%	100%

Estes valores de sensibilidade apresentados pelo INNO-LiPA Rif. TB para a identificação do complexo *M. tuberculosis* e para a detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em isolados clínicos, encontra-se dentro dos valores descritos por outros autores que testaram este sistema de detecção molecular em isolados clínicos (Rossau *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 2005; Bicmen *et al.*, 2008) e demonstram que o INNO-LiPA Rif. TB é proficiente e robusto na identificação do complexo *M. tuberculosis* e na detecção das mutações que conferem resistência à rifampicina, em isolados clínicos.

No respeitante à mutação S531L no gene *rpoB*, mutação detectada em 20 dos 21 isolados clínicos estudados e ausente na estirpe de referência H37Rv (Tabela 10), e uma vez que estes resultados coincidem com o antibiograma de primeira linha no respeitante à resistência à rifampicina, concluímos que neste trabalho, a mutação S531L, é a causa genotípica mais comum para a resistência fenotípica à rifampicina. De facto, esta forte associação entre a mutação S531L e a resistência fenotípica à rifampicina foi descrita por vários autores, sendo também descrito que esta mutação é a mais frequente em isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina na Europa e na Ásia (Williams *et al.*, 1994; Siddiqi *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2003; Abbadi *et al.*, 2009; Negi *et al.*, 2009; Sandgren *et al.*, 2009). Em relação aos estudos que descrevem esta mutação como uma mutação que confere um nível elevado de resistência a este fármaco (Ramaswamy & Musser, 1998; Riska *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2003; Cole *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Zhang & Yew, 2009), no nosso caso não é possível confirmar essa correlação, tendo em conta que não foi possível determinar as CMI's para este antibiótico. Ao analisar os diversos estudos realizados em Portugal, observamos que a referida mutação é a mais comum entre os isolados resistentes à rifampicina (Viveiros *et al.*, 2005; Perdigão *et al.*, 2008; Macedo *et al.*, 2009; Perdigão, *et al.*, 2010). Para além disso, como se pode observar na Tabela 10, dos 21 isolados estudados apenas um era mono-resistente à rifampicina. Estes dados corroboram um

facto descrito por vários autores (Williams *et al.*, 1994; Siddiqi *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2003; Abbadi *et al.*, 2009; Negi *et al.*, 2009; Sandgren *et al.*, 2009) e confirmado no relatório sobre “Anti-tuberculosis drug resistance in the world” da OMS (World Health Organization, 2008a), no qual este organismo internacional demonstra que a mono-resistência à rifampicina a nível mundial é extremamente rara. Esta circunstância, associada à grande correlação entre as mutações na RRDR do gene *rpoB* e a resistência fenotípica à rifampicina, faz das mutações no gene *rpoB*, nomeadamente na RRDR, um excelente marcador de MDR-TB (Telenti, *et al.*, 1993; Somoskovi *et al.*, 2001; Viveiros *et al.*, 2005).

5.1.1.2 MTBDRplus

A aplicação do sistema MTBDRplus na caracterização dos 21 isolados clínicos e da estirpe de referência H37Rv, permitiu identificar todos os isolados como pertencendo ao complexo *M. tuberculosis* (Tabela 10). Ao compararmos estes resultados com os dados obtidos pelo método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960 TB) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe, constatamos que este sistema de detecção molecular identificou correctamente o complexo *M. tuberculosis* nos 21 isolados clínicos pelo que, tal como no INNO-LiPA Rif. TB, também não houve divergências entre os resultados do MTBDRplus e os resultados do método considerado “gold standard” na identificação do complexo *M. tuberculosis* (Tabela 17).

Tabela 17. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe, na identificação do complexo *M. tuberculosis* em isolados clínicos.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Positivo	Negativo	
MTBDRplus	Positivo	21	0	21
	Negativo	0	0	0
Total		21	0	21

(1) Método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe (Gen-Probe Incorporated).

Desta forma, neste trabalho o sistema de detecção molecular MTBDRplus apresenta uma sensibilidade de 100% no que diz respeito à identificação do complexo *M. tuberculosis* em isolados clínicos (Tabela 18).

Tabela 18. Sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema MTBDRplus na identificação do complexo *M. tuberculosis* em isolados clínicos.

MTBDRplus	Sensibilidade	Valor preditivo positivo
Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i>	100%	100%

Em termos de detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina, o MTBDRplus detectou mutações no gene *rpoB* dos 21 isolados clínicos e ausência de mutações no gene *rpoB* na estirpe de referência H37Rv (Tabela 10). Confrontando estes resultados com os dados do método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), verificamos que este sistema detectou correctamente mutações que conferem resistência à rifampicina nos 21 isolados clínicos. Assim, tal como verificado com o INNO-LiPA Rif. TB, também não houve discordâncias entre os resultados do MTBDRplus e os resultados do método considerado “gold standard” na detecção da resistência à rifampicina (Tabela 19).

Tabela 19. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis*.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Resistente	Susceptível	
MTBDRplus	Resistente ⁽²⁾	21	0	21
	Susceptível ⁽³⁾	0	0	0
Total		21	0	21

(1) Método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson); (2) com mutações que conferem resistência à rifampicina; (3) sem mutações que conferem resistência à rifampicina.

Assim, o MTBDRplus apresenta, neste trabalho, um valor de sensibilidade de 100% para a detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis* (Tabela 20). Pelas mesmas razões anteriormente apontadas, optou-se por não apresentar a especificidade e o valor preditivo negativo para a identificação e detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina dos isolados de *M. tuberculosis*, para o sistema MTBDRplus.

Tabela 20. Sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema MTBDRplus na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis*.

MTBDRplus	Sensibilidade	Valor preditivo positivo
Detecção mutações que conferem resistência à rifampicina	100%	100%

No que se refere à detecção de mutações ligadas à resistência à isoniazida, o MTBDRplus detectou a mutação C-15T na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* de 19 isolados, a

mutação S315T no gene *katG* de um isolado e ausência de mutações no gene *katG* e na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* num isolado e na estirpe de referência H37Rv (Tabela 10). Ao compararmos estes resultados com os resultados obtidos pelo método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960 TB), verificamos que este sistema detectou correctamente as mutações descritas como sendo a causa para a resistência à isoniazida em 20 isolados clínicos e identificou correctamente um isolado clínico como susceptível à isoniazida (a estirpe mono-resistente à rifampicina), pelo que, não houve divergências entre os resultados do MTBDRplus e os resultados do método considerado “gold standard” na detecção da resistência à isoniazida (Tabela 21).

Tabela 21. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida em isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis*.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Resistente	Susceptível	
MTBDRplus	Resistente ⁽²⁾	20	0	20
	Susceptível ⁽³⁾	0	1	1
Total		20	1	21

(1) Método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson); (2) com mutações que conferem resistência à isoniazida; (3) sem mutações que conferem resistência à isoniazida.

Deste modo, neste trabalho, este sistema de detecção molecular apresentou um valor de sensibilidade de 100% no que se refere à detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida em isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis* (Tabela 22).

Tabela 22. Sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema MTBDRplus na detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida em isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis*.

MTBDRplus	Sensibilidade	Valor preditivo positivo
Detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida	100%	100%

Os valores obtidos para a identificação do complexo *M. tuberculosis* e detecção de mutações para a resistência à rifampicina em isolados clínicos pelo sistema MTBDRplus, encontram-se na gama dos descritos pelos autores que testaram este sistema de detecção molecular em isolados clínicos (Hillemann *et al.*, 2007; Ling *et al.*, 2008a; Ling *et al.*, 2008b; Huang *et al.*, 2009) e demonstram que este sistema é, tal como o INNO-LiPA Rif. TB, proficiente e robusto na identificação do complexo *M. tuberculosis* e na detecção da resistência à rifampicina, nestas condições. Em particular, os dois sistemas foram concordantes na identificação das mutações presentes no gene *rpoB* destes isolados, S531L (20 isolados) e D516V (1 isolado). No que diz respeito ao valor de sensibilidade (100%) para a detecção da resistência à isoniazida em isolados clínicos, este valor é superior aos valores apresentados pelos diversos autores que testaram este sistema (entre 67% a 94%) (Hillemann *et al.*, 2007; Ling *et al.*, 2008a; Ling *et al.*, 2008b; Huang *et al.*, 2009). Embora este sistema tenha demonstrado competência na detecção da resistência à isoniazida nos isolados clínicos testados, o facto de se ter uma reduzida amostra de isolados clínicos resistentes à isoniazida, explica o resultado obtido. A especificidade para a detecção da resistência à INH não foi calculada dado ao reduzido número de isolados sem resistência fenotípica à isoniazida estudadas nesta amostra.

Em relação à mutação C-15T na região promotora do operão *mabA (fabG1) / inhA*, esta mutação é descrita como a mutação mais comum na região promotora deste operão, não sendo, no entanto, a

mutação mais frequente em isolados resistentes à isoniazida a nível mundial. Este estatuto pertence à mutação S315T no gene *katG* (Hazbón *et al.*, 2006; Vilchêze *et al.*, 2006; Sandgren *et al.*, 2009). Contudo, os nossos resultados e os resultados disponíveis para Portugal demonstram que a mutação C-15T na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA*, ao contrário do que se passa a nível mundial, é a mais comum nos isolados resistentes à isoniazida no nosso país (Perdigão *et al.*, 2008; Macedo *et al.*, 2009; Perdigão, *et al.*, 2010). Guo e colegas descreveram resultados semelhantes, observando que a mutação C-15T na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* é ligeiramente mais frequente que a S315T no gene *katG*, em amostras isoladas em doentes dos Estados Unidos (Guo *et al.*, 2006). Por fim, salienta-se que o método MTBDRplus permitiu distinguir o isolado mono-resistente à rifampicina dos restantes isolados MDR, o que é um avanço tecnológico face ao teste INNO-LiPA Rif. TB. De facto, o MTBDRplus forneceu informação mais completa sobre a resistência aos dois principais antibióticos de primeira linha nos isolados clínicos estudados e critério definidor de MDR (World Health Organization, 2008a; World Health Organization, 2009a; World Health Organization, 2009b; World Health Organization, 2010a), o que está relacionado com as características deste sistema, nomeadamente por ser o único que engloba sondas para as mutações mais comuns presentes em isolados resistentes à isoniazida, para além de conter também sondas para as mutações mais comuns em isolados resistentes à rifampicina.

5.1.2 Amostras clínicas

5.1.2.1 INNO-LiPA Rif. TB

O INNO-LiPA Rif. TB quando usado na caracterização das 33 amostras respiratórias com baciloscopia positiva, identificou 31 amostras como pertencendo ao complexo *M. tuberculosis* e duas amostras como negativas para o complexo *M. tuberculosis* (Tabela 11). Estas últimas corresponderam a isolados posteriormente identificados com *M. avium* e *Mycobacterium intracellulare*. Ao compararmos estes resultados com os obtidos pelo método convencional de

isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe, constatamos que não houve discrepâncias entre os resultados do INNO-LiPA Rif. TB e os resultados do método considerado “gold standard” na identificação do complexo *M. tuberculosis* (Tabela 11 e Tabela 23).

Tabela 23. Correlação entre o sistema INNO-LiPA Rif. TB e o método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe, na identificação do complexo *M. tuberculosis* em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Positivo	Negativo	
INNO-LiPA Rif. TB	Positivo	31	0	31
	Negativo	0	2	2
Total		31	2	33

(1) Método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe (Gen-Probe Incorporated).

Do ponto de vista de execução técnica os dois “verdadeiros negativos” anteriormente referidos apresentaram dois resultados diferentes entre si no respeitante ao resultado obtido por INNO-LiPA Rif. TB: um (amostra 27) não exibiu amplificação após a realização do “Nested” PCR com os “primers” deste sistema e foi identificado como *M. intracellulare* pelo método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação por sondas AccuProbe, e o outro (amostra 7) apresentou amplificação, mas após a hibridação foi identificado como não pertencente ao complexo *M. tuberculosis* sendo posteriormente identificado como *M. avium*. No manual de instruções fornecido com o INNO-LiPA Rif. TB verifica-se que o fabricante descreve que os “primers” utilizados neste teste são específicos para a região do gene *rpoB* responsável pela resistência à rifampicina, nas micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, que este teste foi testado em 289 estirpes de micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* e 52 estirpes de micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, resultando a amplificação

destas 52 estirpes em produtos de pesos moleculares diferentes ou sem qualquer produto detectável. Constatamos assim que apesar das indicações fornecidas pelo fabricante, a amplificação de micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* pode ocorrer com os “primers” deste sistema e que os seus produtos de amplificação podem ter uma dimensão aproximada à da banda específica. No entanto, devido à elevada especificidade da sonda utilizada para o complexo *M. tuberculosis*, os produtos das amplificações inespecíficas não irão hibridar com esta sonda na tira do INNO-LiPA Rif. TB. As restantes amostras testadas não apresentaram problemas na amplificação nem na hibridação com a sonda do complexo *M. tuberculosis*. Desta forma, o INNO-LiPA Rif. TB, neste trabalho, apresentou um valor de sensibilidade e especificidade de 100%, na identificação do complexo *M. tuberculosis* em amostras respiratórias com baciloscopia positiva (Tabela 24).

Tabela 24. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do sistema INNO-LiPA Rif. TB na identificação do complexo *M. tuberculosis* em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

INNO-LiPA Rif. TB	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo
Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i>	100%	100%	100%	100%

Este valor de sensibilidade e especificidade confirma o que já foi demonstrado por outros autores, isto é, o INNO-LiPA Rif. TB é um sistema de detecção molecular específico e sensível na identificação do complexo *M. tuberculosis* directamente em amostras respiratórias com baciloscopia positiva (De Beenhouwer *et al.*, 1995; Johansen *et al.*, 2003; Viveiros *et al.*, 2005; Traore *et al.*, 2006; Costeira & Pina, 2007; Tortoli & Marcelli, 2007; Ogwang *et al.*, 2009). Assim sendo, a amostra a estudar para a detecção directa das mutações que conferem resistência ao

antibiótico rifampicina passa a ficar limitada às 31 amostras positivas para o complexo *M. tuberculosis* anteriormente detectadas e identificadas por este sistema.

Das 31 amostras positivas para o complexo *M. tuberculosis*, 29 foram identificadas pelo INNO-LiPA Rif. TB como sensíveis à rifampicina e duas amostras foram identificadas como contendo mutações que podem conferir resistência à rifampicina (amostra 3 e amostra 26) (Tabela 11). Comparando estes resultados com os dados do método convencional de susceptibilidade em cultura pelo BACTEC MGIT 960TB (“gold standard”), verificamos que o INNO-LiPA Rif. TB detectou correctamente a ausência de mutações para a resistência à rifampicina em 29 amostras (considerados “verdadeiros susceptíveis” face ao “gold standard”), detectou correctamente a resistência à rifampicina numa amostra (“verdadeiro resistente” face ao “gold standard”) e detectou incorrectamente a resistência à rifampicina numa amostra (considerada “falso resistente” face ao “gold standard”) (Tabela 25).

Tabela 25. Correlação entre o sistema INNO-LiPA Rif. TB e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Resistente	Susceptível	
INNO-LiPA Rif. TB	Resistente ⁽²⁾	1	1	2
	Susceptível ⁽³⁾	0	29	29
Total		1	30	31

(1) Método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson); (2) com mutação que confere resistência à RIF; (3) sem mutação que confere resistência à RIF.

O “falso resistente” (amostra 3) apresentou dois padrões de hibridação semelhantes, com ausência de hibridação na sonda S1 ou com uma banda de hibridação com intensidade muito fraca nesta sonda, indicativo de mutação nos codões abrangidos pela referida sonda (Figura 6 e 18). Após sequenciação identificou-se uma mutação no codão 514, nomeadamente a substituição do

nucleótido C na posição 1299 do gene *rpoB*, pelo nucleótido T (Figura 21). Como o codão TTT codifica para o mesmo aminoácido (Fenilalanina) que o codão TTC, esta mutação não altera o aminoácido codificado por este codão, pelo que é uma mutação silenciosa. De referir ainda que esta mutação já foi descrita por outros autores, sempre associada a outras mutações na RRDR do gene *rpoB* (Moghazeh *et al.*, 1996; Senna *et al.*, 2006), o que não se verificou no nosso caso.

A amostra 26 exibiu a mutação H526D (CAC por GAC) e é mono resistente à rifampicina (Tabela 11). Esta mutação é descrita na literatura por usualmente conferir um nível elevado de resistência à rifampicina (CMI superior a 32µg/ml) (Ramaswamy & Musser, 1998; Riska *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2003; Cole *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Zhang & Yew, 2009). Ao compararmos os nossos resultados com os de outros estudos feitos em Portugal e no estrangeiro, averiguamos que esta mutação é frequente a nível internacional, sendo descrita em vários estudos (Sandgren *et al.*, 2009), e que a nível nacional, nos quatro estudos com os quais podemos comparar os nossos dados (Viveiros *et al.*, 2005; Perdigão *et al.*, 2009; Macedo *et al.*, 2009; Perdigão *et al.*, 2010), esta mutação foi referida em apenas um deles (Macedo *et al.*, 2009).

Assim, neste trabalho, o INNO-LiPA Rif. TB apresentou um valor de sensibilidade de 100% e de especificidade de 96,7%, para a detecção mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias com baciloscopia positiva (Tabela 26).

Tabela 26. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do sistema INNO-LiPA Rif. TB na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

INNO-LiPA Rif. TB	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo
Detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina	100%	96,7%	50,0%	100%

Estes valores de sensibilidade e especificidade confirmam o que já foi demonstrado por outros autores (De Beenhouwer *et al.*, 1995; Johansen *et al.*, 2003; Viveiros *et al.*, 2005; Traore *et al.*, 2006; Costeira & Pina, 2007; Ogwang *et al.*, 2009), isto é, que o INNO-LiPA Rif. TB é um sistema de detecção molecular sensível e específico na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

Em resumo, visto que todo o processo desde a descontaminação da amostra, passando pela extração de DNA até ao resultado final do INNO-LiPA Rif TB após revelação do material hibridado, é efectuado entre 24 a 48 horas, podemos considerar que este sistema fornece informação extremamente útil e em tempo útil para o tratamento adequado do doente e para a diminuição do risco de amplificação de resistência aos fármacos em tuberculose (Traore *et al.*, 2006; Viveiros *et al.*, 2005). Assim, o INNO-LiPA Rif. TB apresenta-se como um óptimo sistema de detecção molecular para o diagnóstico precoce da tuberculose e para a detecção da resistência à rifampicina, directamente a partir de amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

5.1.2.2 MTBDRplus

O sistema MTBDRplus, quando usado na caracterização das 33 amostras respiratórias com baciloscopia positiva, identificou 27 amostras positivas para o complexo *M. tuberculosis* e seis amostras negativas para o complexo *M. tuberculosis* (Tabela 11). De salientar que se considerou as amostras que apresentaram amplificação parcial como amostras negativas para a identificação do complexo *M. tuberculosis*, uma vez que de acordo com as instruções do fabricante, estes resultados não são validados. Ao compararmos estes resultados com os do método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe, observamos que o MTBDRplus identificou correctamente o complexo *M. tuberculosis* em 27 amostras respiratórias, identificou correctamente a ausência do complexo *M. tuberculosis* em duas amostras respiratórias e identificou incorrectamente a ausência do complexo

M. tuberculosis em quatro amostras respiratórias (considerados como “falsos negativos” face aos resultados obtidos para o “gold standard”) - Tabela 27.

Tabela 27. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe, na identificação do complexo *M. tuberculosis* em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Positivo	Negativo	
MTBDRplus	Positivo	27	0	27
	Negativo	4	2	6
Total		31	2	33

(1) Método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe (Gen-Probe Incorporated).

Do ponto de vista de execução técnica as duas amostras (amostras 7 e 27) correctamente identificadas pelo sistema MTBDRplus como negativas para o complexo *M. tuberculosis* apresentaram dois resultados diferentes: a amostra 27 não apresentou amplificação após a realização do “Multiplex” PCR e foi identificada como *M. intracellulare* pelo método convencional de isolamento em cultura seguido de identificação por sondas AccuProbe e a amostra 7 apresentou amplificação incompleta após a realização do “Multiplex” PCR mas após a hibridação não exibiu uma banda de hibridação com a sonda do para o complexo *M. tuberculosis*, tendo sido identificada como *M. avium* pelo método convencional de isolamento em cultura seguido de identificação por sondas AccuProbe (Tabelas 11 e 27). De realçar que esta última amostra exibiu hibridação com as sondas para a região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA*, nomeadamente com a sonda de controlo do *locus* e com as sondas de sequência selvagem. Apesar de não ter sido apresentada nenhuma explicação por parte do fabricante deste sistema para esta hibridação, esta deve-se

provavelmente à grande analogia das sequências da região promotora deste gene, nestas duas bactérias.

Os quatro “falsos negativos” foram as amostras 3, 15, 26 e 32. Destas, a amostra 32 não apresentou amplificação após a realização do “Multiplex” PCR e foi identificada como complexo *M. tuberculosis* pelo método convencional de isolamento em cultura seguido de identificação por sondas AccuProbe e as amostras 3, 15 e 26 apresentaram amplificação incompleta (uma banda visível no gel) após a realização do “Multiplex” PCR, tendo-se efectuado hibridação para a amostra 15, a qual não exibiu hibridação com a sonda do complexo *M. tuberculosis*. Estas três amostras foram posteriormente identificadas como complexo *M. tuberculosis* pelo método convencional de isolamento em cultura seguido de identificação por sondas AccuProbe (Tabelas 11 e 27).

Assim, o MTBDRplus, neste trabalho, apresentou um valor de sensibilidade de 87,1% e um valor de especificidade de 100%, no que diz respeito à identificação do complexo *M. tuberculosis* em amostras respiratórias com baciloscopia positiva (Tabela 28).

Tabela 28. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo e valor preditivo positivo do sistema MTBDRplus na identificação do complexo *M. tuberculosis* em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

MTBDRplus	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo
Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i>	87,1%	100%	100%	33,3%

Este valor de sensibilidade apresentado pelo MTBDRplus demonstra que este sistema de detecção molecular não é tão sensível como o sistema INNO-LiPA Rif. TB na identificação do complexo *M. tuberculosis* em amostras respiratórias com baciloscopia positiva. Este resultado é corroborado com os problemas verificados com o “Multiplex” PCR, pois apesar da utilização da

DNA Polimerase recomendada pelo fabricante (HotStarTaq DNA Polimerase da Qiagen), o qual torna este sistema mais dispendioso que o INNO-LiPA Rif. TB, nem sempre foi possível obter boas ampliações (Figura 19 e Tabela 11).

No que se refere à detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina e isoniazida pelo sistema MTBDRplus, apenas podem ser analisados os resultados das 27 amostras que apresentaram amplificação completa depois da realização do “Multiplex” PCR (duas banda visíveis no gel) e que após hibridação foram identificadas por este sistema de detecção molecular como positivas para o complexo *M. tuberculosis*.

Assim, para a detecção da resistência à rifampicina, o MTBDRplus não assinalou qualquer mutação no gene *rpoB* destas 27 amostras (Tabela 11), pelo que ao compararmos estes resultados com os dados do método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), verificamos que este sistema detectou correctamente a ausência de resistência à rifampicina nestas 27 amostras (Tabela 29).

Tabela 29. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Resistente	Susceptível	
MTBDRplus	Resistente ⁽²⁾	0	0	0
	Susceptível ⁽³⁾	0	27	27
Total		0	27	27

(1) Método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson); (2) com mutações que conferem resistência à rifampicina; (3) sem mutações que conferem resistência à rifampicina.

Deste modo, o MTBDRplus, neste trabalho, apresentou um valor de especificidade de 100%, para a detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias com baciloscopia positiva (Tabela 30).

Tabela 30. Especificidade e valor preditivo negativo do sistema MTBDRplus na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

MTBDRplus	Especificidade	Valor preditivo negativo
Detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina	100%	100%

Este valor de especificidade apresentado pelo MTBDRplus, para a detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina em amostras respiratórias encontra-se dentro dos valores descritos pelos autores que testaram este sistema (Ling *et al.*, 2008a; Ling *et al.*, 2008b) e demonstra que este sistema é específico para a detecção da resistência a este antibiótico em amostras respiratórias com baciloscopia positiva. Contudo, este valor tem de ser interpretado com cuidado, pois para o seu cálculo foram apenas consideradas as amostras que apresentaram amplificação total, como já foi referido anteriormente. Assim é necessário ter em consideração que o MTBDRplus apresentou quatro “falsos negativos” na identificação do complexo *M. tuberculosis* e que não foi possível efectuar hibridação para os mesmos, pelo que os seus resultados não entraram nos cálculos da validação analítica da detecção de mutações para a resistência à rifampicina. Estes 100% de especificidade para a detecção de mutações para a resistência à rifampicina são condicionados pela obtenção de produto de amplificação e devem ser enquadrados com os 87,1% de sensibilidade do teste para a identificação do complexo directamente de amostras (Tabela 28). É ainda digno de salientar que um destes “falsos negativos” era fenotipicamente resistente à

rifampicina (amostra 26), o que condiciona os resultados deste sistema e demonstra os problemas que o mesmo apresentou durante a sua execução. Se a validação analítica tivesse sido efectuada com base num “gold standard” clínico e não laboratorial, ou seja com base no diagnóstico clínico final, então os resultados seriam diferentes, originando uma menor proficiência do MTBDRplus na detecção directa.

No que diz respeito à detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida, o MTBDRplus não assinalou qualquer mutação no gene *katG* e na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA*, das 27 amostras. Desta forma, ao confrontarmos estes resultados com os dados do método convencional de susceptibilidade em cultura, verificamos que este sistema identificou correctamente a ausência de mutações que conferem resistência à isoniazida em 26 amostras e identificou incorrectamente a ausência de mutações que conferem resistência à isoniazida numa amostra (Tabela 31).

Tabela 31. Correlação entre o sistema MTBDRplus e o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Resistente	Susceptível	
MTBDRplus	Resistente ⁽²⁾	0	0	0
	Susceptível ⁽³⁾	1	26	27
Total		1	26	27

(1) Método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson); (2) com mutações que conferem resistência à isoniazida; (3) sem mutações que conferem resistência à isoniazida.

O “falso susceptível” (amostra 23) é mono-resistente à isoniazida e exibiu um padrão de hibridação sem qualquer mutação no gene *katG* e na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA*. A ausência de mutação nesta amostra poderá ser explicada pelo facto de cerca de 10 a 25% dos isolados resistentes à INH não apresentarem mutações nos genes *katG* e *inhA* (Cole *et al.*, 2005;

Guo *et al.*, 2006; Hazbón *et al.*, 2006; Ahmad, 2009; Zhang & Yew, 2009). Assim, este fenótipo poderá dever-se a mutações fora dos *loci* analisados ou ainda pela extrusão da isoniazida para o exterior da célula por bombas de efluxo (Viveiros *et al.*, 2002).

É ainda de salientar que dentro dos 26 amostras correctamente identificadas pelo sistema como negativas para a detecção de mutação para a isoniazida, duas amostras (amostras 11 e 17) apresentaram uma banda de hibridação de intensidade fraca com a sonda de controlo do *locus* e com a sonda de sequência selvagem 2 (*inhA* WT2) da região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* (Figura 20). Deste modo, como o fabricante deste sistema explica que somente as bandas com uma intensidade igual ou superior à intensidade da zona de controlo de amplificação devem ser consideradas (Hain Lifescience, 2009), estes resultados obrigariam à invalidação do ensaio e à repetição do mesmo. A explicação mais óbvia para a fraca intensidade destas bandas de hibridação é a reduzida quantidade dos fragmentos amplificados, o que neste caso poderá estar directamente relacionado com problemas na amplificação do “Multiplex” PCR deste sistema. Neste trabalho estas amostras foram validadas, uma vez que havia várias fontes de informação concordantes que permitiram validar o resultado mas as diferenças de amplificação entre os diferentes fragmentos do “Multiplex” é uma limitação evidente na análise dos resultados deste sistema.

Deste modo, o sistema MTBDRplus apresentou, neste trabalho, um valor de especificidade de 100% para a detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida em amostras respiratórias com baciloscopia positiva (Tabela 32).

Tabela 32. Especificidade e valor preditivo negativo do sistema MTBDRplus na detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida em amostras respiratórias com baciloscopia positiva.

MTBDRplus	Especificidade	Valor preditivo negativo
Detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida	100%	96,3%

O valor de especificidade apresentado pelo sistema MTBDRplus para a detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida em amostras respiratórias com baciloscopia positiva encontra-se dentro dos valores descritos pelos autores que testaram este sistema (Ling *et al.*, 2008a; Ling *et al.*, 2008b) confirmando-se que o MTBDRplus é muito específico para a detecção da resistência ao antibiótico acima referido em amostras clínicas com baciloscopia positiva. A sensibilidade para a detecção de mutações que conferem resistência à INH não pode ser calculada dado ao reduzido número de amostras com resistência fenotípica à isoniazida estudadas nesta amostra. Contudo, ficou evidente que a sensibilidade deste sistema é baixa se considerada a sua utilização face ao resultado a transmitir ao clínico, dados os problemas que este sistema apresentou durante a amplificação, pois, o MTBDRplus apresentou quatro falsos negativos na identificação do complexo *M. tuberculosis* o que impossibilitou a realização da hibridação para os mesmos, impedindo que os seus resultados entrassem nos cálculos do sensibilidade e especificidade da detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida, agravado pelo facto de um dos falsos negativos ser fenotipicamente resistente a este antibiótico (amostra 32).

Do ponto de vista do tempo total de execução do protocolo este pode ser efectuado entre 24 a 48 horas até à obtenção do resultado final, tal como no INNO-LiPA Rif. TB, mas, neste trabalho, o sistema MTBDRplus não demonstrou ser uma melhor alternativa ao INNO-LiPA Rif. TB, quando usado directamente em amostras respiratórias, pois apresentou um valor de sensibilidade de 87,1%, no que diz respeito à identificação do complexo *M. tuberculosis* directamente a partir da amostra com baciloscopia positiva e não detectou uma amostra fenotipicamente resistente à INH. Acresce ainda que apresentou problemas com o “Multiplex” PCR, apesar da utilização da Polimerase recomendada pelo fabricante (HotStarTaq DNA Polimerase da Qiagen), o que não só torna este sistema mais dispendioso que o INNO-LiPA Rif. TB, bem como diminui a efectividade do sistema pois dificulta a interpretação dos resultados finais. Estas dificuldades com o “Multiplex” PCR causaram amplificações incompletas ou ausência de amplificação (Tabela 11 e Figura 19) e fraca intensidade nas bandas de hibridação (Tabela 11 e Figura 20), o que impediu a análise de duas

amostras com resistência fenotípica, uma com resistência à RIF (amostra 26) e a outra à INH (amostra 32). Assim, e tendo por base estes resultados o sistema MTBDRplus deve ser utilizado apenas em isolados clínicos, podendo ser um método útil para confirmar e completar os resultados do INNO-LiPA Rif. TB, sobretudo na confirmação de suspeitas de MDR-TB, ao acrescentar a detecção de alvos para a isoniazida.

5.2 Detecção de Tuberculose Extensivamente Resistente (XDR-TB)

Tendo em consideração que um dos Objectivos propostos nesta Dissertação é a identificação rápida de XDR-TB, procurou-se igualmente aferir a proficiência do sistema MTBDRsl, recentemente colocado no mercado, para identificar o complexo *M. tuberculosis* e a resistência aos principais fármacos de segunda linha, de forma a avaliar a utilidade da sua eventual introdução no algoritmo de detecção molecular de marcadores de resistência no Laboratório de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Neste sentido, foram seleccionados os 21 isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis*, provenientes da colecção de culturas do laboratório de Micobactérias do IHMT, UNL anteriormente estudados, dos quais 20 são multiresistentes e um é mono-resistente à rifampicina.

5.2.1 MTBDRsl

A aplicação do MTBDRsl na caracterização dos 21 isolados clínicos e na caracterização da estirpe de referência H37Rv, permitiu identificar em todos o complexo *M. tuberculosis* (Tabela 12). Ao compararmos estes resultados com os dados previamente obtidos para estes isolados constatamos que este sistema de detecção molecular identificou correctamente o complexo *M. tuberculosis* nos 21 isolados clínicos, pelo que não houve divergências entre os resultados do MTBDRsl e os resultados anteriores obtidos, quer pelo método considerado “gold standard” na identificação do complexo *M. tuberculosis*, quer pelos sistemas moleculares de detecção anteriormente testados (Tabela 33).

Tabela 33. Correlação entre o sistema MTBDRsl e o método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe, na identificação do complexo *M. tuberculosis* em isolados clínicos.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Positivo	Negativo	
MTBDRsl	Positivo	21	0	21
	Negativo	0	0	0
Total		21	0	21

(1) Método convencional de isolamento em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson) seguido de identificação do complexo *M. tuberculosis* por sondas AccuProbe (Gen-Probe Incorporated).

Desta forma, neste trabalho, o sistema MTBDRsl apresenta um valor de sensibilidade de 100% no que diz respeito à identificação do complexo *M. tuberculosis* em isolados clínicos (Tabela 34).

Tabela 34. Valores em percentagem de sensibilidade e valor preditivo positivo do sistema MTBDRsl na identificação do complexo *M. tuberculosis* em isolados clínicos.

MTBDRsl	Sensibilidade	Valor preditivo positivo
Identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i>	100%	100%

Este valor de sensibilidade apresentado pelo MTBDRsl na identificação do complexo *M. tuberculosis* em isolados clínicos demonstra que este sistema é proficiente na identificação do complexo *M. tuberculosis*, nestas condições.

No que diz respeito à “performance” do MTBDRsl, este sistema não apresentou dificuldades na amplificação, pois todos os alvos amplificaram em todas as reacções “Multiplex” PCR (Figura 22) e na hibridação não foram observados quaisquer problemas relacionados com a presença de bandas de hibridação inespecífica ou bandas de hibridação de intensidade fraca (Figura 23). O sistema em estudo demonstrou ainda ser rápido, fácil de utilizar e permitiu uma fácil interpretação dos resultados.

No que concerne às mutações detectadas pelo MTBDRsl, foram identificados 12 isolados MDR-TB com mutação no gene *gyrA*, nomeadamente, seis isolados com a mutação S91P, três isolados com a mutação D94A e três isolados com a mutação D94G, os quais tinham também a mutação 1401 (A→G) no gene *rrs* (Tabela 12). Um dado particular é o facto de serem detectadas seis mutações no codão 91 do gene *gyrA*, as mesmas que no codão 94, pois na literatura o codão 94 é descrito como o que tem maior frequência de mutações, seguido do codão 90, apresentado o codão 91 menor frequência de mutações (Siddiqi *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004; Bozeman *et al.*, 2005; Aubry *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2006; Antonova *et al.*, 2008; Benerjee *et al.*, 2008; Mokrousov *et al.*, 2008; van Doorn *et al.*, 2008; Hillemann *et al.*, 2009). No nosso trabalho, verificamos que ambos têm o mesmo número de mutações, não se tendo observado qualquer mutação no codão 90. Mais uma vez, os dados disponíveis para Portugal apresentam resultados semelhantes aos aqui descritos, isto é, uma grande frequência de isolados com a mutação S91P do gene *gyrA*, ausência de isolados com mutações no codão 90 do gene *gyrA* e apresentam isolados com mutações no codão 94, nomeadamente as mesmas encontradas por nós, a D94G e D94A (Perdigão *et al.*, 2010). Deste modo, neste trabalho, o MTBDRsl, identificou três isolados com a mutação D94A no gene *gyrA* e a mutação A1401G no gene *rrs* (Tabela 12), indicadores de se estar na possível presença de estirpes XDR-TB, sendo curioso o facto de estes três isolados serem os únicos que têm mutação no gene *rrs*, de a mutação ser sempre A1401G e ainda desta mutação estar associada à mutação D94A no gene *gyrA*. De facto, o mesmo estudo levado a cabo em Portugal demonstrou resultados semelhantes (Perdigão *et al.*, 2010). Os resultados obtidos por MTBDRsl apenas foram confrontados com os resultados fenotípicos para o antibiótico etambutol, para o qual existe um teste de susceptibilidade validado a nível internacional e considerado como “gold-standard”. Para as restantes mutações, optou-se por não efectuar qualquer análise fenotípica das estirpes estudadas uma vez que esta caracterização está atribuída aos laboratórios de referência nacionais (Direcção Geral da Saúde, 2007), não estando implementado em rotina no nosso laboratório.

Foram ainda identificados seis isolados sem qualquer mutação na região dos genes abrangidos por este sistema, sendo cinco deles MDR-TB e um mono-resistente à rifampicina. A estirpe de referência H37Rv não apresentou, também, qualquer mutação nestes genes (Tabela 12).

Na detecção de mutações que conferem resistência ao etambutol, o MTBDRsl identificou a mutação M306V no gene *embB* em oito isolados (Tabela 12). Comparando estes resultados com os dados do método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), apuramos que este sistema detectou correctamente a presença de mutação que confere resistência ao etambutol em sete isolados clínicos resistentes (considerados “verdadeiros resistentes” face ao “gold standard”), detectou incorrectamente a presença de mutação que confere resistência ao etambutol num isolado clínico sensível (falso resistente), identificou correctamente a ausência de mutação que confere resistência ao etambutol em oitos isolados clínicos susceptíveis (verdadeiros susceptíveis) e identificou incorrectamente a ausência de mutação que confere resistência ao etambutol em cinco isolados clínicos resistentes (falsos susceptíveis) - Tabela 35.

Tabela 35. Correlação do MTBDRsl com o método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB), na detecção de mutações que conferem resistência ao etambutol em isolados clínicos.

		Gold Standard ⁽¹⁾		Total
		Resistente	Susceptível	
MTBDRsl	Resistente ⁽²⁾	7	1	8
	Susceptível ⁽³⁾	5	8	13
Total		12	9	21

(1) Método convencional de susceptibilidade em cultura (BACTEC MGIT 960TB, Becton and Dickinson); (2) com mutações que conferem resistência ao etambutol; (3) sem mutações que conferem resistência ao etambutol.

Desta forma, o MTBDRsl apresenta, neste trabalho, um valor de sensibilidade de 58,3% e de 88,9% de especificidade para a detecção de mutações que conferem resistência ao etambutol em isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis* (Tabela 36).

Tabela 36. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do MTBDRsl na detecção de mutações que conferem resistência ao etambutol em isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis*.

MTBDRsl	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo
Detecção de mutações que conferem resistência ao etambutol	58,3%	88,9%	87,5%	61,5%

Estes valores de sensibilidade e especificidade encontram-se entre os valores descritos pelos autores que testaram este sistema (Hillemann *et al.*, 2009; Brossier *et al.*, 2010; Kiet *et al.*, 2010), e comprovam o que está descrito na literatura sobre as mutações no codão 306 do gene *embB*, isto é, que estas mutações são encontradas entre 30 a 70% dos isolados clínicos resistentes ao etambutol (Riska *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2006; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Sandgren *et al.*, 2009) e que aproximadamente 25 a 35% dos isolados resistentes a este fármaco não apresentam mutações neste codão (Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Zhang & Yew, 2009).

Analisando mais pormenorizadamente estes dados, constatamos que a única mutação encontrada no codão 306 do gene *embB* (M306V, substituição do codão ATG por GTG), é referida na literatura como sendo a mais comum (Riska, *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2006; Pierre-Audigier & Gicquel, 2009; Sandgren *et al.*, 2009) e é também a principal mutação descrita num estudo sobre estirpes portuguesas (Perdigão *et al.*, 2009). Observamos ainda, que tal como já foi descrito por outros autores, esta mutação foi detectada num isolado clínico sensível ao etambutol, o que mantém em aberto a discussão sobre qual o papel exacto da mutação na resistência ao etambutol

(Mokrousov *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2007; Safi *et al.*, 2008; Perdigão *et al.*, 2009). Uma das hipóteses avançada por alguns autores é a de que as mutações no codão 306 do gene *embB* poderão ser usadas como marcador do aumento de resistência a outros antibióticos, nomeadamente como marcador de MDR-TB e XDR-TB (Hazbón *et al.*, 2005; Parsons *et al.*, 2005; Hazbón *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007; Shi, *et al.*, 2007). Analisando os dados da Tabela 12, verificamos que dentro dos 20 isolados multirresistentes estudados, 12 eram resistentes ao etambutol e destes, 7 tinham mutações no codão 306 do gene *embB*. Verifica-se assim que este marcador não detecta de facto todas as estirpes MDR-TB, circunstância já descrita também por Perdigão e colegas para estirpes portuguesas (Perdigão *et al.*, 2009).

Em resumo, o sistema MTBDRsl, no nosso trabalho, demonstrou ser um sistema competente na identificação do complexo *M. tuberculosis* em isolados clínicos e com boa “performance”, pois não apresentou problemas, quer a nível da amplificação, quer a nível da hibridação. Demonstrou ainda ser útil para identificar possíveis isolados XDR-TB, pois é um sistema que permite uma fácil interpretação dos resultados, é rápido e de fácil utilização, podendo contribuir para a identificação rápida de possíveis isolados XDR-TB. Este sistema deve ser usado para complementar os resultados do INNO-LiPA Rif. TB ou MTBDRplus, mais concretamente quando estes dois sistemas de detecção molecular identificam isolados com suspeita de MDR-TB, não podendo de forma alguma substituir o antibiograma de segunda linha. Todavia, no que diz respeito à detecção da resistência ao etambutol em isolados clínicos, o MTBDRsl demonstrou não ser nem sensível (58,3%) nem específico (88,9%), o que já tinha sido referido nas avaliações recentes deste sistema (Hillemann *et al.*, 2009; Brossier *et al.*, 2010; Kiet *et al.*, 2010).

6 Conclusões

Os grandes avanços na biologia molecular e no estudo da base genética da resistência aos antibacilares permitiram desenvolver estratégias efectivas que podem ser usadas para identificar doentes com MDR-TB e possivelmente XDR-TB. Os três sistemas de detecção molecular comerciais testados neste estudo, o INNO-LiPA Rif. TB, o MTBDRplus e o MTBDRsl inserem-se neste contexto. Estes sistemas permitem uma interpretação fácil dos resultados, são fáceis de utilizar, rápidos (podendo fornecer resultados em apenas 24 a 48 horas após colheita da amostra) fornecendo informação extremamente útil para o tratamento do doente e para a prevenção da transmissão de bacilos resistentes e contribuindo deste modo para diminuir o risco de amplificação de resistência aos fármacos e para o controlo da tuberculose. Contudo, apresentam algumas limitações, nomeadamente o número de genes que pode ser analisado permanece limitado, não detectam de mutações localizadas fora dos *loci* alvo e podem detectar mutações silenciosas não relacionadas com a resistência. Neste contexto, a confirmação dos seus resultados é essencial e deve ser feita com o recurso a testes fenotípicos de susceptibilidade.

Os sistemas INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus, quando aplicados a isolados clínicos, apresentaram uma elevada sensibilidade (100%) para a identificação do complexo *M. tuberculosis* e uma elevada sensibilidade (100%) para a detecção de mutações que conferem resistência ao antibiótico de primeira linha rifampicina. No respeitante à detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida, a validação analítica efectuada demonstrou uma sensibilidade de 100% do sistema MTBDRplus. Assim, podemos afirmar que o INNO-LiPA Rif. TB e o MTBDRplus demonstraram neste trabalho, ser fiáveis e competentes na identificação do complexo *M. tuberculosis* e na detecção de mutações para a resistência à rifampicina e isoniazida (apenas MTBDRplus) em isolados clínicos, ou seja, para a detecção de MDR-TB.

O sistema MTBDRsl, por seu lado, demonstrou ser bastante competente para a identificação do complexo *M. tuberculosis*, trazendo uma reduzida mais-valia no que se refere à detecção de

mutações que conferem resistência ao etambutol. A validação analítica efectuada demonstrou que os resultados obtidos com o marcador genético utilizado se correlacionam com a resistência fenotípica ao etambutol em 58,3% dos casos, pelo que a sua utilidade no contexto de um laboratório de micobacteriologia clínica é reduzido. Contudo, este sistema contribuiu para a detecção precoce de três amostras possivelmente XDR-TB, cuja correlação com os resultados fenotípicos será feita posteriormente à conclusão deste trabalho.

Na aplicação directa destes sistemas em amostras com baciloscopia positiva, o INNO-LiPA Rif. TB demonstrou, que é altamente sensível e específico (100%) na identificação do complexo *M. tuberculosis*, bem como na detecção rápida de mutações que conferem resistência à rifampicina (sensibilidade 100% e especificidade 96,7%). Neste trabalho, o sistema MTBDRplus apresentou menor sensibilidade (87,1%), idêntica especificidade (100%) para a identificação do complexo *M. tuberculosis* e idêntica especificidade (100%) para detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina. Demonstrou também uma elevada especificidade (100%) para detecção de mutações que conferem resistência à isoniazida. Contudo, a sensibilidade deste último sistema para a detecção de mutações que conferem resistência à INH e RIF não pode ser calculada dado ao reduzido número de amostras com resistência fenotípica ao fármacos estudadas nesta amostra e dadas as sérias limitações evidenciadas pelo sistema MTBDRplus na amplificação e hibridação, o que impediu a validação processual de um número significativo de amostras. Claramente a amplificação “Multiplex” do MTBDRplus condiciona a qualidade e a efectividade da sua aplicação. Deste modo, o sistema MTBDRplus deve ser utilizado apenas em isolados clínicos como método para confirmação dos resultados do INNO-LiPA Rif. TB, sobretudo na confirmação de suspeitas de MDR-TB, ao acrescentar a detecção de mutações para a isoniazida. Por fim, o MTBDRsl não foi utilizado directamente em amostras clínicas por não terem sido detectadas MDR-TB nas amostras estudadas.

Assim, o sistema INNO-LiPA Rif. TB demonstrou neste trabalho, ser o melhor sistema comercial para utilização directa em amostras respiratórias com baciloscopia positiva, contribuindo inequivocamente para o diagnóstico precoce da tuberculose e para a detecção precoce de mutações que conferem resistência à rifampicina como marcador para a multirresistência. Já o MTBDRplus, não demonstrou, neste trabalho, ser uma alternativa viável ao INNO-LiPA Rif. TB quando usado directamente em amostras respiratórias, pois apresentou baixa sensibilidade para a identificação do complexo *M. tuberculosis*, não detectou uma amostra fenotipicamente resistente à isoniazida e apresentou problemas com o “Multiplex” PCR, apesar da utilização da Taq DNA Polimerase recomendada pelo fabricante, o qual torna este sistema mais dispendioso que o INNO-LiPA Rif. TB por obrigar a repetições dos resultados inconclusivos. Podemos por isso afirmar que, neste trabalho, o sistema MTBDRplus demonstrou ser analiticamente menos eficiente e menos robusto que o sistema INNO-LiPA Rif. TB. Deste modo, o MTBDRplus deve ser utilizado apenas em isolados clínicos, podendo ser um método útil para confirmar e completar os resultados do INNO-LiPA Rif. TB. Por fim, o MTBDRsl poderá ser muito útil quando usado em isolados clínicos, para complementar os resultados do INNO-LiPA Rif. TB e MTBDRplus, mais concretamente quando estes dois sistemas de detecção molecular identificarem isolados suspeitos de ser MDR-TB, não podendo de forma alguma substituir o antibiograma de segunda linha.

Em relação às mutações detectadas com estes três sistemas de detecção molecular, podemos concluir que:

- A mutação S531L no gene *rpoB* foi a principal mutação detectada nos isolados clínicos resistentes à rifampicina estudados neste trabalho;
- A mutação C-15T na região promotora do operão *mabA (fabG1) /inhA* foi a principal mutação detectada nos isolados clínicos resistentes à isoniazida estudados neste trabalho;

- A mutação M306V no gene *embB* foi detectada em 58,3% dos isolados clínicos resistentes ao etambutol e num isolado clínico sensível a este fármaco, o que corrobora a incerteza sobre o papel desta mutação na resistência ao etambutol;
- Esta mesma mutação (M306V no gene *embB*) não pode ser usada como um marcador de MDR-TB, pois foi detectada em apenas oito dos 20 isolados multirresistentes estudados neste trabalho;
- Das 31 amostras respiratórias positivas para o complexo *M. tuberculosis*, apenas uma era resistente à rifampicina (apresentando a mutação H526D no gene *rpoB*).

Por fim, podemos concluir que da avaliação analítica efectuada a estes sistemas para uma eventual integração no algoritmo de trabalho do Laboratório de Micobacteriologia do IHMT,UNL, o sistema INNO-LiPA Rif. TB é o sistema de eleição para a detecção precoce de elementos do complexo *M. tuberculosis* em amostra respiratórias com baciloscopia positiva bem como para a detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina, como marcador precoce MDR-TB. Os sistemas MTBDRplus e MTBDRsl demonstraram ser mais eficientes como sistemas complementares da informação obtida a partir do INNO-LiPA Rif. TB, ao adicionar informação sobre a resistência à isoniazida na aplicação do sistema MTBDRplus directamente às amostras, confirmando-se assim os critérios de MDR-TB. Contudo, a sua aplicação é mais consistente e rentável se for restringida apenas a isolados clínicos. O sistema MTBDRsl demonstrou claramente ser útil apenas na detecção precoce de marcadores de resistência para as fluoroquinolonas e os aminoglicosídeos/péptidos cíclicos, como indicadores precoces de XDR-TB, sendo de pouca utilidade prática a informação obtida acerca da presença de mutações para a resistência ao etambutol.

Conclui-se assim que estes sistemas de detecção molecular são uma mais-valia para a luta contra a tuberculose e para a detecção e prevenção da emergência de resistências, mas a sua utilização no âmbito da marcha geral do diagnóstico micobacteriológico deve ser judiciosamente

equacionada, de forma a que as informações obtidas sejam claras e facilmente interpretadas pelo clínico, como auxiliar da sua tomada de decisão no diagnóstico. Nesse aspecto, os marcadores genéticos para a resistência à rifampicina continuam a evidenciar ser os mais fiáveis e com maior correlação clínico-laboratorial, sendo uma enorme mais-valia que estes sejam detectados directamente em amostras respiratórias com baciloscopia positiva, no âmbito de uma marcha geral do diagnóstico micobacteriológico que se pretende eficiente do ponto de vista laboratorial, efectiva do ponto de vista clínico e economicamente sustentável do ponto de vista da economia do sistema de saúde que suporta a luta contra a tuberculose (Viveiros *et al.*, 2010).

Referências Bibliográficas

A MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1948. Streptomycin Treatment of Pulmonary Tuberculosis: Medical Research Council Investigation. *British Medical Journal*, **4582**: 769-782.

ABBADI, S. H., SAMEAA, G. A., MORLOCK, G., & COOKSEY, R. C., 2009. Molecular identification of mutations associated with anti-tuberculosis drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Infectious Diseases* , **13**: 673-678.

AHMAD, S. M., 2009. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Respiratory Medicine* , **103**: 1777-1790.

ALANGADEN, G. J., KREISWIRTH, B. N., AOUAD, A., KHETARPAL, M., IGNO, F. R., MOGHAZEH, S. L., 1998. Mechanism of Resistance to Amikacin and Kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **42**: 1295–1297.

ALDERWICK, L. J., BIRCH, H. L., MISHRA, A. K., EGGELING, L., & BESRA, G. S., 2007. Structure, function and biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets. *Biochemical Society Transactions* , **35**: 1325-1328.

ALEXANDER, P. E., & DE, P., 2007. The emergence of extensively drug-resistant tuberculosis (TB): TB/HIV coinfection, multidrug-resistant TB and the resulting public health threat from extensively drug-resistant TB, globally and in Canada. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology* , **18**: 289–291.

AMERICAN THORACIC SOCIETY, CDC, AND INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2003. *Treatment of Tuberculosis*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC), 2009. Obtido em 5 de Maio de 2010, de <http://www.atcc.org>

ANTONOVA, O. V., GRYADUNOV, D. A., LAPA, S. A., KUZ'MIN, A. V., LARIONOVA, E. E., SMIRNOVA, T. G., 2008. Detection of Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Genome Determining Resistance to Fluoroquinolones by Hybridization on Biological Microchips. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* , **145**: 108-113.

ANTUNES, A. F., 2010. *Programa nacional de luta contra a Tuberculose, ponto da situação epidemiológica e de desempenho. Relatório para o dia mundial da Tuberculose*. Lisboa: Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose (PNT), Direcção Geral da Saúde.

AUBRY, A., VEZIRIS, N., CAMBAU, E., TRUFFOT-PERNOT, C., JARLIER, V., & FISHER, L. M., 2006. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **50**: 104-112.

BAKER, L. V., BROWN, T. J., MAXWELL, O., GIBSON, A. L., FANG, Z., YATES, M. D., 2005. Molecular Analysis of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from England and Wales Reveals the Phylogenetic Significance of the *ahpC* - 46A Polymorphism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **49**: 1455–1464.

BANERJEE, A., DUBNAU, E., QUEMARD, A., BALASUBRAMANIAN, V., UM, U. K., WILSON, T., 1994. *inhA*, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* , **263**: 227-230.

BARDOU, F., RAYNAUD, C., RAMOS, C., LANEELLE, M. A., & LANÉELLE, G. 1998. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *MiCrobiology* , **144**: 2539-2544.

BASSO, L. A., ZHENG, R., MUSSER, J. M., JACOBS, W. R., & BLANCHARD, J. S., 1998. Mechanisms of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymatic Characterization of

Enoyl Reductase Mutants Identified in Isoniazid-Resistant Clinical Isolates. *The Journal of Infectious Diseases* , **75**: 769-775.

BENERJEE, R., SCHECTER, G. F., FLOOD, J., & PORCO, T., 2008. Extensively drug-resistant tuberculosis: new strains, new challenges. *Expert Reviews*, 713-724.

BICMEN, C., GUNDUZ, A. T., COSKUN, M., SENOL, G., OZKUTUK, N., CIRAK, A. K., 2008. Molecular identification and characterization of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by line probe assay: an approach for rapid diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. *Letters in Applied Microbiology* , **47**: 214-220.

BIFANI, P., MOGHAZEH, S., SHOPSIN, B., DRISCOLL, J., RAVIKOVITCH, A., & KREISWIRTH, B. N. 2000. Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra Variants: Distinguishing the Mycobacterial Laboratory Strain. *Journal of Clinical Microbiology* , **38**: 3200 - 3204.

BLANCHARD, J. S., 1996. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Annual Review of Biochemistry* , **65**: 215-239.

BOZEMAN, L., BURMAN, W., METCHOCK, B., WELCH, L., & WEINER, M., 2005. Fluoroquinolone susceptibility among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States and Canada. *Clinical Infectious Diseases* , **40**: 386-391.

BRENNAN, P. J., 1995. The Envelope of Mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 29-63.

BRENNAN, P. J., & CRICK, D. C., 2007. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry* , **7**: 475-88.

BRENNAN, P., 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* , **83**: 91-97.

- BROSSIER, F., VEZIRIS, N., AUBRY, A., JARLIER, V., & SOUGAKOFF, W., 2010. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology* , **48**: 1683-1689.
- CAMUS, J. C., PRYOR, M. J., MÉDIGUE, C., & COLE, S. T., 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* , **148**: 2967-2973.
- CHENG, A. F., YEW, W. W., CHAN, E. W., CHIN, M. L., HUI, M. M., & CHAN, C. Y., 2004. Multiplex PCR Amplimer Conformation Analysis for Rapid Detection of *gyrA* Mutations in Fluoroquinolone-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **48**: 596-601.
- COLE, S. T., 1996. Rifamycin resistance in mycobacteria. *Research in Microbiology* , **147**: 48-51.
- COLE, S. T., BROSCH, R., PARKHILL, J., GARNIER, T., CHURCHER, C., HARRIS, D., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* , **393**: 109-544.
- COLE, S. T., EISENACH, K. D., MCMURRAY, D. N., & JACOBS, J. W., 2005. *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. Washington, D.C., ASM Press.
- COROS, A., DECONNO, E., & DERBYSHIRE, M. K., 2008. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Insertion Sequence, Is Also Present in the Genome of *Mycobacterium smegmatis*, Suggestive of Lateral Gene Transfer among Mycobacterial Species. *The Journal of Bacteriology* , **190**: 3408–3410.
- COSTEIRA, J., & PINA, J., 2007. Multi-drug resistant tuberculosis and the red queen - diagnosis speed is crucial. *Revista portuguesa de Pneumologia* , **13**: 869-877.

- CRICK, D. C., MAHAPATRA, S., & BRENNAM, P. J., 2001. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* , **11**: 107-118.
- DE BEENHOUWER, H., LHIANG, Z., JANNES, G., MIJS, W., MACHTELINCKX, L., ROSSAU, R., 1995. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tubercle and Lung Disease* , **76**: 425-430.
- DIRECÇÃO GERAL DA SAÚDE, 2007. *Circular Normativa Nº 01/DT de 11/01/07. Testes de Sensibilidade aos Antituberculosos de 2ª Linha*. Lisboa: Direcção Geral da Saúde do Ministério da Saúde de Portugal.
- DJELOUADJI, Z., RAOULT, D., DAFFE, M., & DRANCOURT, D., 2008. A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *PLoS Neglected Tropical Diseases* , **2**: e253.
- DONALD, E., HANS, R., THURIDUR, A., & ARNAUD, T., 2000. *Management of Tuberculosis (5ªed.)*. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease.
- DWORKIN, M., FALKOW, S., & ROSENBERG, E., 2006. *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*. Singapore: Springer.
- DYE, C., & WILLIAMS, B. G., 2000. Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , **97**: 8180-8185.
- FORBES, B. A., SAHM, D. F., & WEISSFELD, A. S., 2002. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (11 edition ed.). St. Lois: Mosby.
- FOX, W., ELLARD, G. A., & MITCHISON, D. A., 1999. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* , **3**: S231-S279.

- GAGNEUX, S., BURGOS, M. V., DERIEMER, K., ENCISO, A., MUÑOZ, S., HOPEWELL, P. C., 2006. Impact of Bacterial Genetics on the Transmission of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens* , **2**: 0603-0610.
- GAY, J. D., DEYOUNG, D. R., & ROBERTS, G. D., 1984. In vitro activities of norfloxacin and ciprofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, and *M. kansasii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **26**: 94-96.
- Ghiladi, R. A., Cabelli, D. E., & Montellano, P. R., 2004. Superoxide Reactivity of *KatG*: Insights into Isoniazid Resistance Pathways in TB. *Journal of the American Chemical Society* , **126**: 4772-4773.
- Ghiladi, R. A., Medzihradszky, K. F., Rusnak, F. R., & Montellano, P. R., 2005. Correlation between Isoniazid Resistance and Superoxide Reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* *KatG*. *Journal of the American Chemical Society* , **127**: 13428-13442.
- Gillespie, S. H., 2002. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **46**: 267-274.
- Guo, H., Seet, Q., Denkin, S., Parsons, L., & Zhang, Y., 2006. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *Journal of Medical Microbiology* , **55**: 1527-1531.
- Gutierrez, M., Brisse, S., R., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., Supply, P., Vincent, V., 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens* , **1**: e98.
- Hai Hua Lin, H. H., Kim, H. Y., Yun, Y. J., Park, C. G., Kim, B. J., Park, Y. G., 2007. Mutations of *katG* and *inhA* in MDR *M. tuberculosis*. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, **63**: 128-138.

HAIN LIFESCIENCE, 2009. *GenoType® MTBDRplus Handbook*. Nehren, Alemanha: Hain Lifescience GmbH.

HAIN LIFESCIENCE, 2010. *GenoType® MTBDRsl Handbook*. Nehren, Alemanha: Hain Lifescience GmbH.

HALL, T., 1998. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, **41**: 95-98.

HATFULL, G. F., & JACOBS, W. R., 2000. *Molecular Genetics Mycobacteria*. Washington, D.C., ASM Press.

HAZBÓN, M. H., VALLE, M. V., GUERRERO, M. I., VARMA-BASIL, M., FILLIOL, I., CAVATORE, M., 2005. Role of embB Codon 306 Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Revisited: a Novel Association with Broad Drug Resistance and IS6110 Clustering Rather than Ethambutol Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **49**: 3794–3802.

HAZBÓN, M. H., BRIMACOMBE, M., VALLE, M. B., CAVATORE, M., GUERRERO, M. I., BASIL, M. V., 2006. Population Genetics Study of Isoniazid Resistance Mutations and Evolution of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **50**: 2640–2649.

HEGDE, S., S., VETTING, M. W., RODERICK, S. L., MITCHENALL, L. A., MAXWELL, A., 2005. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* , **308**: 1480-1483.

HERRERA, L., JIMÉNEZ, S., VALVERDE, A., GARCÍA-ARANDA, M. A., & SÁEZ-NIETO, J., 2003. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996/2001). Description of new mutations in the *rpoB* gene and review of the literature. *International Journal of Antimicrobial Agents* , **21**: 403-408.

HEYM, B., & CALEB, S. T., 1997. Multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Antimicrobial Agents* , **8**: 61-70.

HEYM, B., SAINT-JOANIS, B., & COLE, S. T., 1999. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease* , **79**: 267–271.

HILLEMANN, D., RÜSCH-GERDES, S., & RICHTER, E., 2007. Evaluation of the GenoType MTBDRplus Assay for Rifampicin and Isoniazid Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* , **45**: 2635-2640.

HILLEMANN, D., RÜSCH-GERDES, S., & RICHTER, E., 2009. Feasibility of the GenoType® MTBDRsl Assay for fluoroquinolone, amikacin/capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* , **47**: 1767-1772.

HILLEMANN, D., WEIZENEGGER, M., KUBICA, T., RICHTER, E., & NIEMANN, S., 2005. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology* , **43**: 3699-3703.

HOFFMANN, C., LEIS, A., NIEDERWEIS, M., PLITZKO, J. M., & ENGELHARDT, H., 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , **105**: 3963-3967.

HOLTZ, T. H., & CEGIELSKI, J. P., 2007. Origin of the term XDR-TB. *European Respiratory Journal* , **30**: 396.

HUANG, T. S., KUNIN, C. M., LEE, S. S., CHEN, Y. S., TU, H. Z., & LIU, Y. C., 2005. Trends in fluoroquinolone resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a Taiwanese medical centre: 1995-2003. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **56**: 1058-1062.

- HUANG, W. L., CHEN, H. Y., KUO, Y. M., & JOU, R., 2009. Performance Assessment of the GenoType MTBDRplus Test and DNA Sequencing in Detection of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* , **47**: 2520–2524.
- INNOGENETICS, 2007. *INNO-LiPA Rif.TB Handbook*. Gent, Bélgica: Innogenetics.
- JOHANSEN, I. S., LUNDGREN, B., SOSNOVSKAJA, A., & THOMSEN, V. Ø., 2003. Direct detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens in low- and high-incidence countries by line probe assay. *Journal of Clinical Microbiology* , **41**: 4454-4456.
- JOHANSEN, S. K., MAUS, C. E., PLIKAYTIS, B. B., & DOUTHWAITE, S., 2006. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *tlyA*-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Molecular Cell* , **23**: 173-182.
- JOHNSON, R., STREICHER, E. M., LOUW, G. E., WARREN, R. M., VAN HELDEN, P. D., & VICTOR, T. C., 2006. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Issues in Molecular Biology* , **8**: 97-112.
- JUGHELI, L., BZEKALAVA, N., DE RIJK, P., FISSETTE, K., PORTAELS, F., & RIGOUTS, L., 2009. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **53**: 5064-5068.
- KENT, P. T., & KUBICA, G. P., 1985. *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services.
- KIET, V. S., LAN, N. T., AN, D. D., DUNG, N. H., HOA, D. V., VAN VINH CHAU, N., 2010. Evaluation of the MTBDRsl test for detection of second-line-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**: 2934-2939.

- KOCAGÖZ, T., HACKBARTH, C. J., UNSAL, I., ROSENBERG, E. Y., NIKAIDO, H., & CHAMBERS, H. F., 1996. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **40**: 1768-1774.
- LARSEN, M. H., VILCHÈZE, C., KREMER, L., BESRA, G. S., PARSONS, L., SALFINGER, M., 2002. Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, **2**: 453–466.
- LEE, A. S., LIM, I. H., TANG, L. L., & TELENTI, A., 1999. Contribution of *kasA* Analysis to Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **43**: 2087-2089.
- LEE, H., CHO, S. N., BANG, H. E., LEE, J. H., BAI, G. H., KIM, S. J., 2000. Exclusive mutations related to isoniazid and ethionamide resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* , **4**: 441–447.
- LEE, A. S., TEO, A. S., & WONG, S. Y., 2001. Novel Mutations in *ndh* in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **45**: 2157-2159.
- LEE, A. S., TANG, L. L., LIM, I. H., & WONG, S. Y., 2002. Characterization of pyrazinamide and ofloxacin resistance among drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Singapore. *International Journal of Infectious Diseases* , **6**: 48-51.
- LEE, A. S., OTHMAN, S. N., HO, Y. M., & WONG, S. Y., 2004. Novel Mutations within the *embB* Gene in Ethambutol-Susceptible Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **48**: 4447-4449.
- LENNIK, H. B., BRUSSELS, F. P., GULLEGEM, M. N., & EKEREM, R., 2001. *Patente N.º US 6,329,138 B1*. United States.

- LEUNG, E. T., HO, P. L., YUEN, K. Y., WOO, W. L., LAM, T. H., KAO, R. Y., 2006. Molecular Characterization of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of a Novel Mutation in *inhA*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **50**: 1075–1078.
- LING, D. I., ZWERLING, A. A., & PAI, M., 2008a. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *European Respiratory Journal* , **32**: 1165-1174.
- LING, D. I., ZWERLING, A. A., & PAI, M., 2008b. Rapid diagnosis of drug resistant TB using line probe assays: from evidence to policy. *Expert Reviews* , **2**: 583-588.
- LUNA, J. C., 2003. *A Tuberculosis Guide for Specialist Physicians*. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease.
- LUNA, J. A., 2005. *A Tuberculosis Guide for Specialist Physicians*. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease.
- MACEDO, R., AMORIM, A., & PEREIRA, E., 2009. Multidrug-resistant tuberculosis: rapid molecular detection with MTBDRplus assay in clinical sample. *Revista Portuguesa de Pneumologia* , **15**: 353-365.
- MARDANI, M., 2007. The emergence and impact of extensively drug-resistant tuberculosis. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases* , **2**: 1-3.
- MAUS, C. E., PLIKAYTIS, B. B., & SHINNICK, T. M., 2005a. Mutation of *tlyA* Confers Capreomycin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **49**: 571–577.
- MAUS, C. E., PLIKAYTIS, B. B., & SHINNICK, T. M., 2005b. Molecular Analysis of Cross-Resistance to Capreomycin, Kanamycin, Amikacin, and Viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **49**: 3192–3197.

- MDLULI, K., SLAYDEN, R. A., ZHU, Y., RAMASWAMY, S., XI PAN, X., MEAD, D., 1998. Inhibition of a Mycobacterium tuberculosis b-Ketoacyl ACP Synthase by Isoniazid. *Science* , **280**: 1607-1610.
- MIESEL, L., WEISBROD, T. R., MARCINKNEVICIENE, J. A., BITTMAN, R., & JACOBS, W. R., 1998. NADH Dehydrogenase Defects Confer Isoniazid Resistance and Conditional Lethality in *Mycobacterium smegmatis*. *The Journal of Bacteriology* , **180**: 2459-2467.
- MIGLIORI, G. B., MATTEELLI, A., CIRILLO, D., & PAI, M., 2008. Diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: Current standards and challenges. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology* , **19**: 169-172.
- MIKUSOVÁ, K., SLAYDEN, R. A., BESRA, G. S., & BRENNAN, P. J., 1995. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **39**: 2484-2489.
- MOGHAZEH, S. L., PAN, X., ARAIN, T., STOVER, C. K., MUSSER, J. M., & KREISWIRTH, B. N., 1996. Comparative antimycobacterial activities of rifampicin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **40**: 2655-2657.
- MOKROUSOV, I., OTTEN, T., VYSHNEVSKIY, B., & NARVSKAYA, O., 2002. Detection of *embB306* Mutations in Ethambutol-Susceptible Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: Implications for Genotypic Resistance Testing. *Journal of Clinical Microbiology* , **40**: 3810-3813.
- MOKROUSOV, I., OTTEN, T., MANICHEVA, O., POTAPOVA, Y., VISHNEVSKY, B., NARVSKAYA, O., 2008. Molecular Characterization of Ofloxacin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from Russia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **52**: 2937-2939.

- MORGAN, M., KALANTRI, S., FLORES, L., & PAI, M., 2005. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases* , **5**: 62.
- MORLOCK, G. P., METCHOCK, B., SIKES, D., CRAWFORD, J. T., & COOKSEY, R. C., 2003. *ethA*, *inhA*, and *katG* Loci of Ethionamide-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **47**: 3799–3805.
- MURRAY, P. R., & PFALLER, M. A., 2009. *Medical microbiology* (6^a Edição ed.). Philadelphia: Mosby.
- MURRAY, P. R., BARON, E. J., JORGENSEN, J. H., PFALLER, M. A., & YOLKEN, R. H., 2003. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology.
- MUSSER, J. M., 1995. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. *Clinical Microbiology Reviews* , **8**: 496-514.
- NARANG, S. K., 2009. Extensively Drug Resistant Tuberculosis(XDR-TB). *JK SCIENCE* , **11**: 102-103.
- NEGI, S. S., SINGH, U., GUPTA, S., KHARE, S., RAI, A., & LAL, S., 2009. Characterization of *rpoB* gene for detection of rifampicin drug resistance by SSCP and sequence analysis. *Indian Journal of Medical Microbiology* , **27**: 226-230.
- OGWANG, S., B., A. B., TRAORE, H., MUMBOWA, F., OKWERA, A., EISENACH, K. D., 2009. Comparison of rapid tests for detection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Kampala, Uganda. *BMC Infectious Diseases* , **26**: 139-148.
- PAGÁN-RAMOS, E. M., PRITCHETT, C. L., REIMSCHUESSEL, R., TRUCKSIS, M., TIMMINS, G. S., & DERETIC, V., 2006. Molecular and Physiological Effects of Mycobacterial *oxyR* Inactivation. *The Journal of Bacteriology* , **188**: 2674-2680.

- PARSONS, L. M., SALFINGER, M., CLOBRIDGE, A., DORMANDY, J., MIRABELLO, L., POLLETTA, V. L., 2005. Phenotypic and Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Resistant to both Isoniazid and Ethambutol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **49**: 2218–2225.
- PAYTON, M., AUTY, R., DELGODA, R., EVERETT, M., & SIM, E., 1999. Cloning and Characterization of Arylamine N-Acetyltransferase Genes from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: Increased Expression Results in Isoniazid Resistance. *The Journal of Bacteriology* , **181**: 1343-1347.
- PERDIGÃO, J., MACEDO, R., JOÃO, I., FERNANDES, E., BRUM, L., & PORTUGAL, I., 2008. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. *Microbial Drug Resistance* , **14**: 133-143.
- PERDIGÃO, J., MACEDO, R., MALAQUIAS, A., FERREIRA, A., BRUM, L., & PORTUGAL, I., 2010. Genetic analysis of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Lisbon, Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 224-227.
- PERDIGÃO, J., MACEDO, R., RIBEIRO, A., BRUM, L., & PORTUGA, L. I., 2009. Genetic characterisation of the ethambutol resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis*: prevalence and significance of *embB306* mutations. *International Journal of Antimicrobial Agents* , **33**: 334-338.
- PIATEK, A. S., TELENTI, A., MURRAY, M. R., EL-HAJJ, H., JACOBS, W. R., & KRAMER, F. R., 2000. Genotypic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Two Distinct Populations Using Molecular Beacons: Implications for Rapid Susceptibility Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **44**: 103-110.
- PIERRE-AUDIGIER, C., & GICQUEL, B., 2009. *The contribution of molecular biology in diagnosing tuberculosis and detecting antibiotic resistance*. Molecular Tuberculosis.

- PILLAY, M., & STURM, W., 2007. Evolution of the Extensively Drug-Resistant F15/LAM4/KZN Strain of *Mycobacterium tuberculosis* in KwaZulu-Natal, South Africa. *Clinical Infectious Diseases*, 1409-1414.
- PITAKSAJAKUL, P., WONGWIT, W., PUNPRASIT, W., EAMPOKALAP, B., PEACOCK, S., & RAMASOOTA, P., 2005. Mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from TB patients in Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **4**: 228-237.
- PLINKE, C., RÜSCH-GERDES, S., & NIEMANN, S., 2006. Significance of Mutations in *embB* Codon 306 for Prediction of Ethambutol Resistance in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**: 1900–1902.
- PORTUGAL, I., MAIA, S., MONIZ-PEREIRA, J., 1999. Discrimination of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 fingerprint subclusters by *rpoB* gene mutation analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**: 3022-3024.
- RAMASWAMY, S. V., REICH, R., DOU, S. J., JASPERSE, L., PAN, X., WANGER, A., 2003. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**: 1241–1250.
- RAMASWAMY, S., & MUSSER, J. M., 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung Disease*, **79**: 3-29.
- RATTAN, A., KALIA, A., & NISHAT AHMAD, N., 1998. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Molecular Perspectives. *Emerging Infectious Diseases*, **4**: 195-209.
- RINDI, L., BIANCHI, L., TORTOLI, E., LARI, N., BONANNI, D., & GARZELLI, C., 2005. Mutations responsible for *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid resistance in Italy. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **9**: 94–97.

- RISKA, P. F., JACOBS, W. R., & ALLAND, D., 2000. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, S4-S10.
- RISTOW, M., MÖHLIG, M., RIFAI, M., SCHATZ, H., FELDMANN, K., & PFEIFFER, A., 1995. New isoniazid/ethionamide resistance gene mutation and screening for multidrugresistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *TheLancet* , **346**: 502-503.
- ROSSAU, R., TRAORE, H., BEENHOUWER, H., MIJS, W., JANNES, G., & RIJK, P., 1997. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB Assay, a Reverse Hybridization Assay for the Simultaneous Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Its Resistance to Rifampicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **41**: 2093-2098.
- ROUSE, D. A., LI, Z., BAI, G. H., & MORRIS, S. L., 1995. Characterization of the *katG* and *inhA* Genes of Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **39**: 2472-2477.
- ROZWARSKI, D. A., GRANT, G. A., BARTON, D. H., JACOBS, W. R., & SACCHETTINI, J. C., 1998. Modification of the NADH of the Isoniazid Target (*InhA*) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* , **279**: 98-102.
- RUSSELL, D. G., BARRY, C. E., & FLYNN, J. L., 2010. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. *Science* , **328**: 852-856.
- RYAN, K. J., & RAY, G., 2004. *Sherris Medical Microbiology : An Introduction to Infectious Diseases* (4ª Edição ed.). New York: McGraw-Hill Medical.
- SAFI, H., SAYERS, B., HAZBOÓN, M. H., & ALLAND, D., 2008. Transfer of *embB* Codon 306 Mutations into Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Strains Alters Susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, and Rifampicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **52**: 2027-2034.

SANDGREN, A., STRONG, M., MUTHUKRISHNAN, P., WEINER, P. K., CHURCH, G. M., & MURRAY, M. B., 2009. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. *PLoS Medicine*, **6**: 132-136.

SEKIGUCHI, J., MIYOSHI-AKIYAMA, T., AUGUSTYNOWICZ-KOPEC, E., ZWOLSKA, Z., KIRIKAE, F., TOYOTA, E., 2007. Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**: 179–192.

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

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

SHEN, X., SHEN, G., WU, J., GUI, X., LI, X., JIAN MEI, J., 2007. Association between *embB* Codon 306 Mutations and Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**: 2618–2620.

SHENOI, S., & FRIEDLAND, G., 2009. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: A New Face to an Old Pathogen. *The Annual Review of Medicine*, **60**: 307–320.

SHI, R., ZHANG, J., LI, C., KAZUMI, Y., & SUGAWARA, I., 2006. Emergence of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by *gyrA* mutation analysis using denaturing high-pressure liquid chromatography and DNA sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 4566-4568.

SHI, R., ZHANG, J., OTOMO, K., ZHANG, G., & SUGAWARA, I., 2007. Lack of correlation between *embB* mutation and ethambutol MIC in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**: 4515-4517.

- SIDDIQI, N., SHAMIM, M., SEEMA HUSSAIN, C. R., AHMED, N., PRACHEE, BANERJEE, S., 2002. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Patients in North India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **46**: 443–450.
- SMITH, I., 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews* , **16**: 463–496.
- SOMOSKOVI, A., PARSONS, L. M., & SALFINGER, M., 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory Research* , **2**: 164-168.
- SPIGELMAN, M. K., 2007. New tuberculosis therapeutics: a growing pipeline. *The Journal of Infectious Diseases* , **196**: 28-34.
- SREEVATSAN, S., PAN, X., STOCKBAUER, K. E., CONNELL, N. D., KREISWIRTH, B. N., WHITTAM, T. S., 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , **94**: 9869-9874.
- SREEVATSAN, S., PAN, X., ZHANG, Y., DERETIC, V., & MUSSER, J., 1997. Analysis of the oxyR-ahpC Region in Isoniazid-Resistant and Susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms Recovered from Diseased Humans and Animals in Diverse Localities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **41**: 600-606.
- STARKS, A. M., GUMUSBOGA, A., PLIKAYTIS, B. B., SHINNICK, T. M., & POSEY, J. E., 2009. Mutations at *embB* Codon 306 Are an Important Molecular Indicator of Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **53**: 1061–1066.

- SUN, Y. J., LEE, A. S., WONG, S. Y., & PATON, N. I., 2007. Analysis of the role of *Mycobacterium tuberculosis kasA* gene mutations in isoniazid resistance. *Clinical Microbiology and Infection* , **13**: 816–842.
- SUZUKI, Y., KATSUKAWA, C., TAMARU, A., ABE, C., MAKINO, M., MIZUGUCHI, Y., 1998. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* , **36**: 1220-1225.
- TAKAYAMA, K., & KILBURN, J. O., 1989. Inhibition of Synthesis of Arabinogalactan by Ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **33**: 1493-1499.
- TAKIFF, H. E., SALAZAR, L., GUERRERO, C., PHILIPP, W., HUANG, W. M., KREISWIRTH, B., 1994. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **38**: 773-780.
- TANIGUCHI, H., CHANG, B., ABE, C., NIKAIDO, Y., MIZUGUCHI, Y., & YOSHIDA, S. I., 1997. Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system. *The Journal of Bacteriology* , **179**: 4795-4801.
- TELENTI, A., IMBODEN, P., MARCHESI, F., LOWRIE, D., COLE, S., COLSTON, M. J., 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *TheLancet* , **341**: 647-650.
- TENOVER, F. C., 2001. Development and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents: An Overview. *Clinical Infectious Diseases* , **33**: S108–115.
- TIMMINS, G. S., & DERETIC, V., 2006. Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology* , **62**: 1220–1227.

- TORTOLI, E., & MARCELLI, F., 2007. Use of the INNO LiPA Rif.TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampicin susceptibility. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* , **26**: 51–55.
- TRAORE, H., DEUN, A., SHAMPUTA, I. C., RIGOUTS, L., & PORTAELS, F., 2006. Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNA and Rifampicin Resistance in Clinical Specimens from Tuberculosis Patients by Line Probe Assay. *Journal of Clinical Microbiology* , **44**: 4384–4388.
- TRUANT, A. L., 2002. *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*. Washington, D.C., ASM Press.
- ULLRICH, M., 2009. *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. Norfolk: Caister Academic Press.
- UPTON, A. M., MUSHTAQ, A., VICTOR, T. C., SAMPSON, S. L., SANDY, J., SMITH, D. M., 2001. Arylamine N-acetyltransferase of *Mycobacterium tuberculosis* is a polymorphic enzyme and a site of isoniazid metabolism. *Molecular Microbiology* , **42**: 309-317.
- VAN DOORN, H. R., D. D. AN, D. D., JONG, M. D., LAN, N. T., HOA, D. V., QUY, H. T., 2008. Fluoroquinolone resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* with locked nucleic acid probe real-time PCR. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* , **12**: 736-742.
- VERNON, C. S., SANDY, J., VICTOR, T. C., SIM, E., & VAN HELDEN, P. D., 2005. Mutational and expression analysis of *tbnat* and its response to isoniazid. *Journal of Medical Microbiology* , **54**: 1189–1197.
- VILCHÈZE, C., & JACOBS, W. R., 2007. The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics. *Annual Review of Microbiology* , **61**: 35-50.

- VILCHÈZE, C., WANG, F., ARAI, M., HAZBÓN, M. H., COLANGELI, R., KREMER, L., 2006. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nature Medicine* , **12**: 1027-1029.
- VILCHÈZE, C., WEISBROD, T. R., CHEN, B., KREMER, L., HAZBÓN, M. H., WANG, F., 2005. Itered NADH/NAD Ratio Mediates Coresistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **49**: 708-720.
- VIVEIROS, M., PORTUGAL, P., BETTENCOURT, R., VICTOR, T. C., JORDAAN, A. M., LEANDRO, C., 2002. Isoniazid-Induced Transient High-Level Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **46**: 2804-2810.
- VIVEIROS, M., LEANDRO, C., & AMARAL, L., 2003. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *International Journal of Antimicrobial Agents* , **22**: 274-278.
- VIVEIROS, M., LEANDRO, C., RODRIGUES, R., ALMEIDA, A., BETTENCOURT, R., COUTO, I., CARRILHO, L., DIOGO, J., FONSECA, A., LITO, L., LOPES, J., PACHECO, T., PESSANHA, M., QUIRIM, J., SANCHO, L., SALFINGER, M., AMARAL L., 2005. Direct Application of the INNO-LiPA Rif.TB Line-Probe Assay for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains and Detection of Rifampicin Resistance in 360 Smear-Positive Respiratory Specimens from an Area of High Incidence of MDR-TB. *Journal of Clinical Microbiology* , **43**: 4880–4884.
- VIVEIROS, M., MARTINS, M., COUTO, I., RODRIGUES, L., MACHADO, D., PORTUGAL, I., AMARAL, L., 2010. Molecular tools for rapid identification and novel effective therapy against MDRTB/XDRTB infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, **8**: 465-480.
- WANG, J. C., 1991. DNA topoisomerases: why so many? *The Journal of Biological Chemistry* , **266**: 6659-6662.

- WANG, J. Y., LEE, L. N., LAI, H. C., WANG, S. K., JAN, I. S., YU, C. J., 2007. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* , **59**: 860-865.
- WARREN, R. M., STREICHER, E. M., GEY VAN PITTIUS, N. C., VAN DER SPUY, G. D., SIGEL, V. S., DONALD, P. R., 2009. The clinical relevance of Mycobacterial pharmacogenetics. *Tuberculosis* , **89**: 199-202.
- WEI, C. J., LEI, B., MUSSER, J. M., & TU, S. C., 2003. Isoniazid Activation Defects in Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG) Mutants Evident in *InhA* Inhibitor Production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **47**: 670–675.
- WILLIAMS, D. L., WAGUESPACK, C., EISENACH, K., CRAWFORD, J. T., PORTAELS, F., SALFINGER, M., 1994. Characterization of rifampicin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **38**: 2380-2386.
- WINDER, F. G., & COLLINS, P. B., 1970. Inhibition by Isoniazid of Synthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of General Microbiology* , **63**; 41-48.
- WIRTH, T., HILDEBRAND, F., ALLIX-BÉGUEC, C., WÖLBELING, F., KUBICA, T., KREMER, K., 2008. Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS Pathogens* , **4**: e1000160.
- WOLUCKA, B., MCNEIL, M. R., DE HOFFMANN, E., CHOJNACKI, T., & BRENNAN, P., 1994. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**: 23328-23335.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. *World Health Organization Press* .

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control. *Weekly epidemiological record*, 81, 430-432.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008a. *Anti-tuberculosis drug resistance in the world, 4th global report*. Geneva: World Health Organization Press.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008b. *Molecular Line Probe Assays For Rapid Screening of Patients at Risk of Multidrug-Resistant Tuberculosis*. Geneva: World Health Organization Press.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008c. *Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs*. Geneva: World Health Organization Press.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009a. *Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report*. Geneva: World Health Organization Press.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009b. *Treatment of Tuberculosis: guidelines, Fourth edition*. Geneva: World Health Organization Press.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010a. *Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response*. Geneva: World Health Organization Press.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010b. *World Health Organization Media centre Tuberculosis Fact sheet*. Obtido em 2 de Dezembro de 2010, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>

YOUNG, D., PERKINS, M., DUNCAN, K., & BARRY, C., 2008. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 118: 1255-1265.

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

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

ZHENG, H., LU, L., WANG, B., PU, S., ZHANG, X., ZHU, G., 2008. Genetic Basis of Virulence Attenuation Revealed by Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS ONE* , **3**.