



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Instituto Nacional de Infectologia

Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO PROFISSIONAL
PESQUISA CLINICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MARCIA APARECIDA DA SILVA PEREIRA

TÍTULO:
DETECÇÃO RÁPIDA DA TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE POR MÉTODO
MOLECULAR

RIO DE JANEIRO

2020

MARCIA APARECIDA DA SILVA PEREIRA

**DETECÇÃO RÁPIDA DA TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE POR MÉTODO
MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do Grau de Mestre em Pesquisa Clínica.

Rio de Janeiro

2020

Pereira, Marcia Aparecida da Silva .

Detecção rápida da tuberculose multirresistente por método molecular /
Marcia Aparecida da Silva Pereira. - Rio de Janeiro, 2020.
127 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto Nacional de Infectologia
Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica, 2020.

Orientadora: Sandra Wagner .

Co-orientadora: Fátima Cristina Onofre Fandinho.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Tuberculose resistente. 3. MAS-PCR.
I. Título.

MARCIA APARECIDA DA SILVA PEREIRA

**DETECÇÃO RÁPIDA DA TUBERCULOSE MULTIRESISTENTE POR MÉTODO
MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação do Instituto Nacional de Infectologia
Evandro Chagas para obtenção do título de
Mestre.

Área de concentração: Doenças Infecciosas

Orientadora: Dr^a. Sandra Wagner Cardoso

Co-orientadora: Dr^a. Fátima Cristina O. Fandinho

Aprovado em 31/01/2020.

Banca Examinadora

Dr. Hugo Perazzo Pedroso Barbosa -INI/FIOCRUZ (Presidente/Revisor)

Dr. Eric Henrique Roma de Lima -INI/FIOCRUZ (Membro)

Dr^a. Karen Machado Gomes -ENSP/FIOCRUZ (Membro)

Dr^a. Luciane de Souza Velasque - UNIRIO/UNIRIO (Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe, que sempre me incentivou a continuar estudando e acreditou que conseguiria concluir essa etapa importante da minha vida. Ao meu pai (em memória), que onde estiver está feliz com essa minha conquista. Aos meus familiares, que com muito carinho me apoiaram para que eu chegasse até aqui e ao meu esposo, pelo companheirismo, paciência, amore por comemorar comigo cada conquista alcançada. Dedico essa conquista a vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido força, sabedoria, perseverança e coragem para não desistir durante toda esta longa caminhada.

À minha orientadora, Dr^a. Sandra Wagner Cardoso, médica do Instituto Nacional de Infectologia (INI-Fiocruz), pela oportunidade, conhecimento, confiança e por tornar possível a conclusão deste trabalho.

À minha co-orientadora, Dr^a. Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes, pesquisadora da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP-Fiocruz), pela paciência e, principalmente, pelo auxílio em toda metodologia e escrita desta dissertação.

Ao Dr. Hélio Siqueira, médico epidemiologista da Universidade Estadual do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), pelo incentivo e pelas informações epidemiológicas valiosas relacionadas à gravidade e diagnóstico das doenças pulmonares, em especial tuberculose.

Ao colega MS.Paulo Caldas, pela ajuda na montagem do fluxograma das atividades, na descrição metodológica, pelo conhecimento técnico científico e pela força nos momentos de desespero.

À Dr^a. Karen Machado, pelas contribuições científicas e pela amizade.

À banca examinadora da disciplina de qualificação composta pelas Drs. Marília Santini e Elizabeth de Souza Neves e os doutores Dr. Saint Clair dos Santos Gomes Júnior e Dr. Hugo Perazzo que forneceram sugestões importantes para a execução desse estudo.

Aos professores e equipe do Mestrado Profissional do INI, por todo conhecimento passado, por ajudar a superar os desafios e limites no processo ensino-aprendizagem, pelo apoio acadêmico, pela força, incentivo e pelos esclarecimentos no momento de dúvidas e insegurança em todo o período do curso.

À ENSP e à Comissão de Ética em pesquisa por aprovar e apoiar a execução dessa pesquisa.

Toda a equipe do Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF), pelo acolhimento, por facilitarem minhas saídas do laboratório para resolver atividades relacionadas as exigências do mestrado e por permitir o uso das amostras utilizadas na pesquisa, sem as quais seria impossível a realização desse estudo.

Aos servidores, bolsistas e estagiários do Laboratório do CRPHF que me incentivaram, que estiveram dispostos a ajudar na busca de bons resultados na realização da pesquisa.

Em especial à equipe de Segurança, Manutenção e do Serviço Geral do CRPHF, pelo carinho e amizade e que sempre mantiveram uma estrutura laboratorial segura, limpa e aconchegante.

Todos os meus colegas do alojamento, pelo carinho e pela troca de experiência, conhecimento e também pelos incríveis e saudosos encontros fraternais.

Aos colegas de turma do curso de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica (MPPC/Edital2017 – INI) pelo carinho, amizade e pela ajuda nos momentos mais difíceis.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente, o meu mais sincero agradecimento.

*“A possibilidade de realizarmos um sonho
é o que torna a vida interessante”*

Paulo Coelho

RESUMO

Pereira, M.A.S. **Detecção rápida da tuberculose multirresistente por método molecular.**

Dissertação de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas- Rio de Janeiro 2020.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a tuberculose é classificada como tuberculose droga resistente (TB-DR) quando o isolado de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) apresenta resistência a qualquer um dos fármacos testados e tuberculose multirresistente (TB-MDR) quando o isolado do MTB apresenta resistência à, pelo menos, isoniazida (INH) e rifampicina (RIF) simultaneamente. A resistência à RIF tem sido associada a mutações no gene *rpoB* (códon 531, 526 e 516) e a resistência a INH têm sido relacionadas aos genes *katG*, *inhA*, *ahpCe* *kasA*, sendo a mutação no códon 315 do gene *katG*, a mais citada para resistência a este fármaco. Neste contexto, métodos moleculares têm sido propostos para a detecção de mutações gênicas em isolados de MTB que possam estar associadas à resistência aos fármacos RIF e INH a fim de agilizar o diagnóstico da TB-DR e intervir na cadeia de transmissão da doença. O presente estudo avaliou o desempenho da PCR multiplex alelo específico (MAS-PCR) na detecção de TB-DR e TB-MDR. A metodologia, MAS-PCR teve como alvos os genes *rpoB*, *katG* e *inhA-15*. Os resultados foram comparados com o método fenotípico e genotípico “padrão ouro” TSA-MGIT960 e Sequenciamento de DNA respectivamente. A MAS-PCR foi capaz de detectar a resistência gênica em 95,4% dos casos investigados. A concordância entre os métodos molecular foram avaliadas utilizando o software. “R” versão 3.6. Nossos resultados demonstram que a técnica, MAS-PCR pode ser uma boa ferramenta de triagem para a detecção da TB-DR e TB-MDR.

Palavras-Chave: *Mycobacterium Tuberculosis* Multirresistente. Tuberculose resistente. MAS-PCR.

ABSTRACT

Pereira, M.A.S. **Rapid detection of multiresistant tuberculosis by molecular**

method. Professional Master's Dissertation in Clinical Research in Infectious Diseases of the National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas - Rio de Janeiro 2020.

According to the World Health Organization (WHO) tuberculosis (TB) is classified as drug-resistant tuberculosis (TB-DR) when *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) isolate is resistant to any of the multidrug-resistant TB drugs. (MDR-TB) when the MTB isolate is resistant to, at least, isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) simultaneously. Resistance to RIF has been linked to mutations in *rpoB* gene (codons 531, 526 and 516). For INH, resistance-associated mutations have been reported in the *katG*, *inhA*, *ahpC*, and *kasA* genes, with the mutation at codon 315 of the *katG* gene being the most frequent. In this context, molecular methods have been proposed for the detection of gene mutations in MTB isolates that may be associated with drug resistance in order to expedite the diagnosis of TB-DR and to intervene in the MDR-TB transmission chain. The present study evaluated the performance of allele-specific multiplex PCR (MAS-PCR) in detecting TB-DR and TB-MDR. The MAS-PCR methodology applied in this study targeted *rpoB*, *katG* and *inhA-15* genes. Results were compared with the phenotypic and genotypic “gold standard” method TSA-MGIT960 and DNA sequencing respectively. MAS-PCR was able to detect gene resistance in 95.4% of the investigated cases. Agreement between the methods was evaluated using software "R" Our results demonstrate that the MAS-PCR technique can be a good screening tool for TB-DR and MDR-TB detection.

Key-words: *Mycobacterium Tuberculosis* Resistant. Resistant tuberculosis. MAS-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de ação dos principais fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.....	27
Figura 2	Apresentação online do software do Sistema de Gerenciamento do Ambiente Laboratorial (GAL).....	47
Esquema 1	Localização de ligação dos primers utilizados no MAS-PCR ao sítio alvo do genes <i>rpoB</i> (A), <i>katG</i> (B) e região promotora <i>inhA-15</i> (C) do <i>M. tuberculosis</i>	55
Figura 3	Eletoforese em gel de agarose 2% dos padrões alelos específicos “WT” e “Mutado” observado.....	56
Figura 4	Frequência das mutações detectadas pelo sequenciamento nos códons 531,526 e 516 do gene <i>rpoB</i> entre os 122 isolados investigados nesse estudo.....	61
Figura 5	Frequência das mutações detectadas no códon 315 do gene <i>katG</i> e <i>Mab-InhA-15</i> dos 122 isolados analisados nos estudos.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Frequência dos mutantes do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> naturalmente resistente aos fármacos em meio de cultura sólidos Lowenstein-Jensen.....	28
Quadro 2	Principais estudos que propõe o MAS-PCR como uma boa ferramenta de diagnóstico da Tuberculose resistente, multirresistern e extensivamente rersistente.....	40
Quadro 3	Principais estudos que contribuíram para o conhecimento das bases moleculares da resistência do <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	42
Quadro 4	Principais estudos nacionais que contribuíram para a caracterização e frequência das principais mutações associadas a resistência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a Rifampicina e Isoniazida nos genes <i>rpoB</i> e <i>katG</i> , respectivamente.....	43
Quadro 5	Modelo de planilha do estoque do banco de cepas do laboratório do Centro de Referência Professor Hélio Fraga.....	46
Quadro 6	Iniciadores (Primers) para os gens alvos <i>rpoB</i> <i>katG</i> e <i>mab-inhA</i> utilizados no sequenciamento de DNAnesse estudo.....	50
Quadro 7	Condições da reação da PCR Sequenciamento de DNA para os genes alvos <i>rpoB</i> , <i>katG</i> , <i>mab-inhA</i>	52
Quadro 8	Primer utilizados no MAS-PCR para detecção de mutações nos genes <i>rpoB</i> , <i>kat</i> Ge região promotora <i>inhA-15</i>	53
Quadro 9	Condições de preparo da primeira etapa do Mix MAS-PCR para detecção de múltiplos Alelos específicos nos códons <i>rpoB531</i> e <i>inhA-15</i>	54
Quadro 10	Condições de preparo da Segunda etapa para reação do Mix MAS-PCR para detecção de múltiplos Alelos específicos nos códons <i>rpoB526</i> , <i>rpoB516</i> e <i>KatG315</i>	54
Quadro 11	Parâmetros de amplificação dos múltiplos alelos específicos (MAS-PCR). 55	55
Quadro 12	(a, b, c):Tempo de execução das técnicas TSA-MGIT960 ^R , sequenciamento de DNA e MAS-PCR em 12 amostras.....	69
Quadro 13	Comparação do custo, tempo médio de execução, interpretação e liberação do resultado dos testes MGIT960, Sequenciamento e MAS-PCR para uma amostra.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Padrão de resistência fenotípico aos fármacos Rifampicina e isoniazida dos 122 isolados.....	59
Tabela 2	Padrão fenotípico dos 115 isolados analisados pelo MGIT 960 ^R	60
Tabela 3	Frequência das Mutações encontradas no presente estudo pelo sequenciamento de DNA para os genes alvos <i>rpoB</i> , <i>KatG</i> e <i>Mab-inhA-15</i>	62
Tabela 4	Frequência das mutações nos genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> e região promotora <i>inhA-15</i> detectada pelo MAS-PCR.....	63
Tabela 5	Comparação do MAS-PC com o teste TSA-MGIT960 ^R na detecção fenotípico da resistência aos fármacos RIF e INH.....	64
Tabela 6	Análise MAS-PCR comparado ao teste fenotípico TSA-MGIT960.....	64
Tabela 7	Comparação da MAS-PCR com o Sequenciamento de DNA na detecção das mutações pontuais nos códons 531, 526 e 516 do gene <i>rpoB</i>	65
Tabela 8	Comparação da MAS-PCR e Sequenciamento de DNA na determinação das mutações no gene <i>katG315</i> e na região promotora <i>inhA-15</i>	68
Tabela 9	Resumo do percentual de detecção do padrão de resistência encontrado entre as metodologias avaliadas nesse estudo (dos 122 isolados).	64
Tabela 10	MAS-PCR na detecção dos casos de tuberculose monoresistente a isoniazida (TB-mono-INH).....	67
Tabela 11	MAS-PCR na detecção dos casos de TB-MDR.....	68
Tabela 12	Resultado da reavaliado visual dos 3 observadores, dos padrões, MAS-PCR “Mutados” e “WT” após foto de gel de agarose.....	71
Tabela 13	Comparação da leitura visual entre os 3 observadores dos 73 padrões MAS-PCR.....	72
Tabela 14	Grau categórico adotado para a concordância dos padrões “WT” e “Mutados” observados pelos 3 observadores no presente estudo.....	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

A	Adenina
Arn	Asparagina
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	Bacilo de Calmet-Guerin
C	Citosina
°C	Grau Celsius
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CRPHF	Centro de Referência Professor Hélio Fraga
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse	Enzima catalisadora de ácido desoxirribonucléico
DNTp	Desoxirribo nucleotídeo trifosfatado
dATP	Desoxiadenosinatrifosfato
dCTP	Desoxicitosinatrifosfatado
dGTP	Desoxiguanosinatrifosfatado
Dttp	Desoxitimidinatrifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
bem	Etambutol
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Guanina
Gln	Glutamina
G	Gramas
His	Histidina
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
INH	Isoniazida
INI	Instituto Nacional de Infectologia
<i>katG</i>	Catalase-peroxidase
Leu	Leucina
LJ	Lowenstein-Jensen
MAS-PCR	Reação em cadeia da Polimerase de Múltiplos Alelos Especifico

Met	Metionina
MDR	Resistente a múltiplas drogas
Mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Min	Minuto
MS	Ministério da Saúde
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Ng	Nanogramas
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PZA	Pirazinamida
Qsp	Quantidade suficiente para
R	Resistente
RIF	Rifampicina
<i>rpoB</i>	Subunidade beta (β) da RNA polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
S	Sensível
Ser	Serina
SM	Estreptomomicina
Seg	Segundos
T	Timina
TB	Tuberculose
TB-DR	Tuberculose Droga resistente
TB-MDR	Tuberculose Resistente a Multiplasdrogas
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente
TBE	Tris-borato-EDTA
Ter	Treonina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano-Ácido clorídrico

Taq	<i>Thermusaquaticus</i>
U	Unidade
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitro (10^{-6} Litro)
µM	Micromolar (10^{-6} Molar)
µ	Micrômetro
V	Valina
v/v	Volume/volume
Volts	Voltagem
WHO	World Health Organization
XDR	Extensivamente resistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA E REFERENCIAL TEÓRICO	
	METODOLOGICO	22
2.1	Tuberculose resistente (Breve história)	22
2.2	Principais Fármacos antituberculose (anti-TB)	23
2.2.1	Rifampicina (RIF).....	23
2.2.2	Isoniazida (INH).....	24
2.2.3	Pirazinamida (PZA).....	24
2.2.4	Etambutol (EMB).....	25
2.3	Mecanismo de ação dos principais fármacos antituberculose (anti-TB)	25
2.4	Mecanismos de resistência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> aos principais fármacos anti-TB	27
2.5	A resistência aos fármacos anti-TB no Brasil	30
2.6	Diagnóstico da tuberculose resistente aos fármacos	32
2.6.1	Principais Métodos fenotípicos para detecção da tuberculose resistente.....	33
2.6.1.1	Método das proporções.....	33
2.6.1.2	Método BactecMGITR.....	33
2.6.1.3	Método Microscopic Observation Direct Susceptibility Assay (MODS).....	34
2.6.1.4	Método TSA do Nitratase.....	35
2.6.1.5	Análise da amplificação de micobacteriófagos.....	35
2.6.2	Principais Métodos genotípicos ou moleculares para detecção da tuberculose resistente	36
2.6.2.1	Análise por sonda genética.....	36
2.6.2.2	Análise da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	36
2.6.2.2a	Sequenciamento do DNA.....	37
2.6.2.2b	PCR em tempo real (qPCR).....	37
2.6.2.2c	Nested-PCR.....	38
2.6.2.2d	PCR-Multiplex.....	39

2.7	Importâncias de avaliar mutações e sua frequência no diagnóstico da tuberculose resistente	40
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	METODOLOGIA	45
4.1	Desenho do estudo	45
4.2	Amostras	45
4.3	Banco de cepas	45
4.4	Plano de recrutamento	46
4.5	Critérios de Inclusão e Exclusão	47
4.6	Extração de DNA a partir do estoque de cultivo	48
4.7	Eletroforese da extração do DNA	48
4.8	Teste de Sensibilidade Fenotípico – TSA-MGIT 9690R	49
4.9	Teste Genotípico para determinação dos genes de resistência- Sequenciamento de DNA	52
4.10	Teste Molecular dos Múltiplos Alelos Específicos (MAS-PCR)	56
4.11	Análises retroativa do padrão de resistência fenotípica	56
4.12	Calculo do tempo de execução e Custo	57
4.13	Reanalise dos Padrões MAS-PCR	57
4.14	Aspectos éticos	58
5	RESULTADOS	59
5.1	Resultados do teste Fenotípico (MGITR 960)	59
5.2	Resultados do Teste Genotípico (Sequenciamento)	60
5.3	Resultados do teste Molecular (MAS-PCR)	62
5.4	Comparação do MAS-PCR com o teste Fenotípico (TSA)	63
5.5	Comparação do MAS-PCR com o teste Genotípico. (Sequenciamento de DNA)	64
5.6	MAS-PCR no diagnóstico dá TB resistente	67
5.7	Avaliação do Método, MAS-PCR	68
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO	77
	REFERENCIAS	78

APENDICES.....	109
TERMO DE CONFIABILIDADE.....	109
TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE COM A PESQUISA.....	110
TERMO DE UTILIZAÇÃO DE BANCO DE CEPAS.....	112
JUSTIFICATIVA DA NECESSIDADE DO PARECER DA DISPENSA DA ANÁLISE ÉTICA AO CEP/ENSP.....	114
ANEXO.....	117
TABELA GERAL.....	117

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que afeta, prioritariamente, os pulmões, embora possa acometer outros órgãos e sistemas (BRASIL 2011^a). É uma doença grave com fortes raízes sociais e ainda estigmatizada (PORTO, 2007).

Desde 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a TB como uma emergência mundial. A OMS afirma que, em 2016, 10,4 milhões de pessoas adoeceram de TB no mundo e cerca de 1,3 milhões de pessoas morreram em decorrência da doença. O coeficiente de incidência da TB global em 2017 foi de 34,8/100.000hab. (WHO, 2018).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) diz que em 2016 a taxa de óbitos em decorrência da TB foi de 4.426 e que em 2017, foram registrados 69.569 casos novos da doença (BRASIL, 2018).

Segundo a OMS, uma das principais causas para o aumento global das taxas de TB nas últimas décadas é a crescente resistência bacteriana e a demora no diagnóstico da tuberculose droga resistente (TB-DR) (WHO, 2010). Dos 8,7 milhões de novos casos de TB relatados no mundo, no período de 2010-2011, por exemplo, lamentavelmente, menos de 5% foram submetidos a um teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) (WHO, 2017).

Em termos de saúde pública, no Brasil, a resistência aos fármacos anti-TB utilizados como primeira linha de tratamento (rifampicina[RIF], isoniazida[INH], pirazinamida[PZA] e etambutol[EMB]) agrava a evolução dos sintomas da doença, dificulta a cura e tem alto custo para o Sistema Único de Saúde (SUS). Nos casos de resistência aos fármacos de segunda linha (amicacina[AM], ofloxacina[OFL], canamicina[KN] e capreomicina[CAP]), o tratamento é mais complexo e mais prolongado, além disso, têm custo ainda mais alto para o SUS, aumenta os efeitos adversos e quase sempre leva a óbito (BRASIL, 2011^a).

Sobretudo, infelizmente, o diagnóstico tardio e a falta de recursos dos laboratórios têm se mostrado o elo mais fraco para o desenvolvimento de um sistema confiável de vigilância e controle das formas mais graves de tuberculose resistente aos fármacos (WHO, 2011^a).

O método para identificação da TB ainda hoje utilizado na maioria dos laboratórios clínicos é a cultura em meio sólido *Lowenstein-Jensen* (LJ), tendo os resultados liberados em um período que varia entre 90 a 120 dias. No final da década de 1990, o sistema automatizado MB/BactecMGIT960^R, com cultura em meio líquido, passou a ser considerado

“padrão ouro” para o diagnóstico da TB-DR, permitindo detectar bacilos resistentes aos fármacos entre 7 e 14 dias (BRASIL, 2005). Lamentavelmente no decorrer desse tempo, o paciente que apresentar TB-DR ainda continuará liberando formas microbianas resistentes no ambiente, mesmo que esteja sendo tratado, com base no quadro clínico ou pela presença de um exame de baciloscopia de escarro positivo, o que em geral ocorre com a utilização do esquema básico de tratamento para TB (BRASIL, 2011^a).

Essa situação nos leva a crer que avaliar a sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) aos antimicrobianos constitui uma das tarefas mais importantes dos laboratórios clínicos (WHO, 2012).

No Brasil, no ano de 2011, por exemplo, menos de 1% dos novos casos de TB e apenas 6% dos casos de retratamento foram submetidos ao teste TSA (BRASIL, 2014). A dificuldade de detectar precocemente e conter a transmissão de casos de tuberculose resistente aos fármacos são de maior gravidade no país. Além disso, o surgimento de casos de tuberculose multirresistente (TB-MDR) que são resistentes aos dois principais fármacos anti-TB (RIF e INH) vem também acarretando problemas em termos de controle, tratamento e de medidas de saúde pública (DALCOLMO, *et al.*, 2007; KRITSKI, *et al.*, 2010).

Em decorrência desses fatos, o Brasil ocupa o 20^o lugar entre os países com maior taxa de TB e vem contribuindo para o panorama atual da TB-DR que, segundo a OMS, atingiu valores de aproximadamente, 4,8% da população mundial infectada em 2017 (WHO, 2018).

Diante disso, considera-se globalmente que novas medidas devem ser tomadas para conter o espalhamento da TB-DR e TB-MDR. Para a OMS umas dessas medidas incluem o desenvolvimento de metodologias que permitam um diagnóstico mais rápido e mais preciso da TB-DR e TB-MDR (WHO, 2012).

Nas últimas décadas, técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido bastante promissoras, dentre elas o sistema Gene XpertTM vem se destacando. O sistema Gene XpertTM combina a preparação da amostra clínica direta do escarro com a extração do ácido desoxirribonucléico (DNA), PCR em tempo real e a detecção de mutantes resistentes a RIF em um único processo (HELB, *et al.*, 2010). O teste fornece resultado em menos de 2 horas (VAN RIE, A. *et al.*, 2010).

Embora, esse sistema em demonstrando ser bastante eficaz no diagnóstico da TB-MDR apresenta a limitação de detectar resistência somente à RIF, além disso, o equipamento tem alto custo e a distribuição dos insumos (reagentes e cartuchos) ainda são

vinculadas exclusivamente as empresas que comercializam os kits (PINTO, *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2017).

Por este motivo, o desenvolvimento ou padronização de técnicas moleculares mais simples, sem a exigência de equipamentos e insumos de alto custo, e que detecte resistência a múltiplos fármacos tem sido considerados promissores porque podem contribuir para o diagnóstico rápido da TB-DR e TB-MDR. (IMPERIALE *et al.*, 2011, YANG *et al.*, 2005).

Diante desse cenário, na tentativa de agilizar o diagnóstico da TB-DR e TB-MDR, a proposta do presente estudo foi avaliar uma metodologia molecular baseada em PCR-Multiplex como ferramenta de diagnóstico rápido da TB-DR e TB-MDR.

A técnica da PCR Multiplex Alelo Específico (MAS-PCR) descrito por Mokrousov e colaboradores em 2002, foi a nossa metodologia de escolha, por se tratar de uma técnica considerada de baixo custo, menos laboriosa e que não utiliza equipamentos sofisticados em comparação a outros métodos moleculares (IMPERIALE, 2011; YANG *et al.*, 2005, GRUPTA *et al.*, 2013).

2 REVISÃO DA LITERATURA E REFERENCIAL TEÓRICO METODOLÓGICO

2.1 Tuberculose resistente (Breve história)

O surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e de cepas de MTB resistentes aos fármacos anti-TB na década de 80 fez ressurgir o panorama da epidemia da tuberculose no país. No final do século XX, a TB passou a ser novamente percebida como um grave problema de saúde pública em termos individuais e coletivos (ANTUNES *et al.*, 2000). Em 2017, o país teve uma ocorrência de 1.900 (Um mil e novecentos) casos de resistência a RIF/TB-DR entre os casos em tratamento da TB (BRASIL/MS/PNCT, 2018).

A OMS considera todo indivíduo portador de TB que apresente teste de susceptibilidade revelando resistência bacilar para qualquer um dos fármacos anti-TB, como tuberculose droga resistente (TB-DR). A resistência pode ser classificada como “resistência primária”, quando o paciente nunca foi tratado para TB e tem bacilos resistentes, ou “resistência adquirida”, nesse caso, o indivíduo foi diagnosticado inicialmente com TB sensível e desenvolveu resistência após exposição aos medicamentos ou foi infectado já com bacilos resistentes e não foi detectado pelo TSA (WHO, 2006^a).

A comunidade científica pressupõe que a resistência em isolados de MTB vem ocorrendo, desde a introdução dos medicamentos anti-TB, por pressão seletiva (TELENTI, *et al.*, 1993; HEIFETS; CANGELOSI, 1999).

Sobretudo, estudos também deixam claro que a resistência do MTB aos fármacos está associada a mutações pontuais, deleções ou inserções no genoma do bacilo (SEKIGUCHI *et al.*, 2007) sendo elevada a taxa de mutação espontânea, inerente a cada medicamento (KOCH; MIZRAHI; WARNER, 2014).

A gravidade da TB-DR primária e adquirida é estabelecida de acordo com a resposta ao tratamento. A resistência primária aos fármacos de primeira-linha de tratamento (RIF, INH, PZA e EMB), por exemplo, agrava a evolução dos sintomas da doença, já a resistência adquirida, em casos de contatos com paciente infectado com bacilo resistente, além de dificultar o tratamento da doença contribui para o espalhamento da tuberculose resistente (BRASIL/MS/SVS, 2011).

A OMS define como TB-MDR todos os casos de TB causada por bacilo que apresentar resistência à RIF e INH, associada ou não a outro fármaco. A tuberculose extensamente resistente (TB-XDR), atualmente, é definida e caracterizada por ser causada

por bacilo que apresente resistência à RIF e INH associada à resistência às fluoroquinolonas e, pelo menos, um fármaco anti-TB injetável (CAP, KAN e AK), sendo considerada uma forma mais grave da doença (WHO 2008; CHIANG CY, 2010).

A verdade é que as causas e os mecanismos moleculares de resistência aos fármacos anti-TB parecem ser bastante complexos e não muito bem definidos, apesar de estarem sendo globalmente estudados (HISBELLO, 1999; ALMEIDA DA SILVA, 2011; PALOMINO, 2011; SMITH *et al.*, 2012). Isso nos leva a pensar na necessidade de estratégias governamentais emergenciais para conter o espalhamento da TB-DR no Brasil.

De acordo com a OMS, para o país atingir as metas de eliminação da TB-DR serão necessários esforços adicionais com o comprometimento das três esferas do SUS-Municipal, Estadual e Federal (WHO, 2006^a).

2.2 Principais Fármacos antituberculose

Os principais fármacos anti-TB utilizados no esquema primário de tratamento da TB são: Rifampicina, (RIF), Isoniazida (INH), Pirazinamida (PZA) e Emtabutol (EMB).

2.2.1 Rifampicina

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

Além do efeito bactericida sobre as bactérias metabolicamente ativas, o fármaco também possui uma ação esterilizante excelente frente às bactérias em estado de latência (QUIRÓS-ROLDÁN *et al.*, 2001). Atua impedindo a transcrição e tradução do DNA do MTB (SATO, *et al.*, 2003).

A RIF é um fármaco muito efetivo no combate ao MTB e é um dos principais quimioterápicos de primeira linha utilizados no tratamento da TB. Foi introduzida no esquema terapêutico anti-TB a partir da década de 60. A dosagem diária é de 600mg para pacientes com 50kg ou mais, de 450mg para pacientes com menos de 50 kg, geralmente em

uma única administração. Para crianças até 12 anos é de 10 – 15 mg/kg de peso corpóreo (recomenda-se não superar a dose diária de 600mg). A RIF (substância ativa) deve, em geral, ser associado a outros tuberculostáticos. (SATO *et al.*, 2003).

2.2.2 Isoniazida (INH).

A INH ou hidrazida do ácido isonicotínico é um fármaco efetivo contra a TB sendo também um dos principais quimioterápicos de primeira linha no tratamento. Após sua descoberta em 1912, foi potente agente contra MTB em 1952 (ROSSETI *et al.*, 2002).

O fármaco é bacteriostático para os bacilos com baixa multiplicação, mas é bactericida para os microrganismos que se multiplicam rapidamente. Possui boa absorção no sistema digestivo humano, podendo ocorrer significativa metabolização hepática por acetilação na primeira passagem pelo fígado. Entretanto, diferenças no metabolismo hepático, como indivíduos acetiladores rápidos e lentos para o fármaco, são descritos na literatura, sendo que os indivíduos acetiladores lentos tendem a produzir mais manifestações de hepatotoxicidade ao fármaco do que os indivíduos acetiladores rápidos. Além disso, a meia-vida da INH é de, aproximadamente, uma hora nos acetiladores rápidos e de três a cinco horas nos acetiladores lentos, elevando ainda mais a presença de hepatopatias. Quanto a duração da ação da INH no organismo esta é prolongada, pois os níveis sanguíneos exigidos para agir contra as microbactérias são muito baixos, permitindo o uso de dose única diária em dias alternados em casos de TB (LUNA *et al.*, 2001; TEIXEIRA, R. *et al.*, 2011).

2.2.3 Pirazinamida (PZA)

A PZA é um análogo estrutural da nicotinamida e tem sido usada, nos últimos 50 anos, no esquema primário de tratamento contra TB, juntamente com INH e RMP. Por sua vez, a PZA, contribuiu para a redução do tempo de tratamento da TB de 12 para 6 meses. É conhecida comercialmente como “Pirazinon” e tem grande influência no ataque de bacilos semidormentes, destruindo a parede celular. Esse fármaco tem alta atividade em meios ácidos (pH=5,5), o que é característico de focos inflamatórios de TB, onde, geralmente, encontram-se esses bacilos (LIMA, C. H. S. *et al.*, 2011).

A atividade da PZA é altamente específica contra *MTB*, apresentando pouco ou nenhum efeito em outras microbactérias, incluindo *Mycobacterium bovis* que demonstra um alto nível de resistência intrínseca a esse fármaco. Entretanto, a PZA deve ser combinada a outros medicamentos para apresentar eficácia contra a TB, uma vez que o *MTB* pode oferecer resistência a esses medicamentos e for utilizado de forma isolada (LIMA, C. H. S. *et al.*, 2011).

2.2.4 Etambutol (EMB)

O EMB, denominado quimicamente como dextro-etilenodiamino-di-1-butanol-dihidroclorido, é um antimicrobiano sintético, amplamente empregado no esquema primário de tratamento da TB e outras microbactérias como o complexo *Mycobacterium avium* *Mycobacterium kansasii*. No tratamento da TB primária o EMB em combinação com outros fármacos como isoniazida, rifampicina e pirazinamida é bastante eficaz (YENDAPALLY, R. *et al.*, 2008).

2.3 Mecanismo de ação dos principais fármacos antituberculose.

Os principais mecanismos de ação dos fármacos utilizados no esquema básico de tratamento da TB consistem na atuação na síntese da parede celular, na síntese de ATP e na transcrição e tradução do DNA do *MTB* (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

O mecanismo de ação da RIF, por exemplo, é inibir a RNA-polimerase dependente de DNA nas células procarióticas, porém não nas eucarióticas (RIEDER, 2002). Isto ocorre pela ligação da RIF à enzima RNA-polimerase, a qual forma um complexo fármaco enzimático estável, inibindo a cadeia de formação da síntese de RNA mensageiro do *MTB*, mais especificamente a subunidade beta dessa enzima (ZHANG; YEW, 2009).

O mecanismo de ação da INH é mais complexo e ainda pouco entendido, o que se sabe é que este fármaco é uma pró-droga e precisa ser ativada pela catalase-peroxidase (KatG) do bacilo. No processo de ativação, a proteína KatG promove a remoção de dois elétrons da INH tornando-a um intermediário ativo. A forma ativa da droga inibe a atividade das proteínas Enoil- (transportadora de acilreductase) (InhA) e a proteína β -cetoacil- (transportadora de acilsintetase) (KasA), que participam na síntese dos ácidos micólicos da

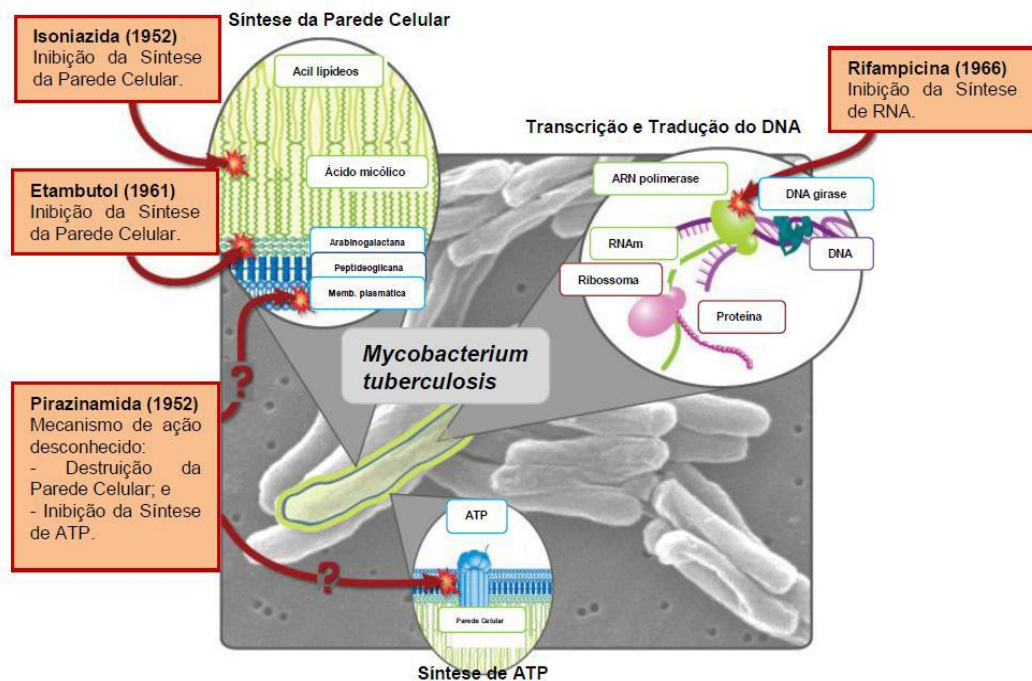
parede celular do MTB. Mais especificamente, a proteína codificada pelo gene *inhA* estabelece uma ligação no seu local ativo com o NADH, utilizando-o como co-factor (ZHANG; YEW, 2009). Por sua vez, a INH ativada liga-se covalentemente com o carbono 4 do NADH. O complexo InhA-NADH, na presença de oxigênio e magnésio, inibe a síntese de ácidos micólicos, que é um componente essencial para a formação da parede celular das microbactérias (RATTAN; KALIA; AHMAD, 1998).

A INH também inibe a catalase-peroxidase microbacteriana (enzima de ativação da INH) responsável pela formação da parede celular. Em outras palavras, a exposição à INH leva a diminuição da quantidade de lipídios extraídos por metanol, tornando o MTB suscetível aos radicais de oxigênio e a outros fatores do meio, ocasionando a perda da permeabilidade da parede celular do bacilo o que leva à sua morte (RATTAN; KALIA; AHMAD, 1998).

A PZA é considerada um pró-fármaco, visto que a PZA é convertida em ácido pirazinóico (POA) pela enzima bacteriana dependente de ferro conhecida como pirazinamidase (PZAse). O POA promove a acidificação e a alteração do potencial de membrana, o que induz a morte do bacilo. É um fármaco bastante eficaz, com alto poder esterilizante e com a principal ação em bacilos dormentes (LIMA, C. H. *et al.*, 2011). A respeito da ação esterilizante do fármaco, estudos relatam que a PZA possui alta atividade *in vivo* e pouca atividade *in vitro*. Acredita-se que esse comportamento seja atribuído ao intenso processo inflamatório que ocorre durante a infecção pelo MTB, que provoca acidificação no local das lesões (SALFINGER, M., 1988; ZHANG, Y., 2003; LIMA, C. H. S., 2011).

O mecanismo de ação do EMB não se conhece totalmente. Sabe-se que atua diretamente sobre a síntese de arabinose do MTB, difunde-se na micobactéria e, ao que parece, suprime a multiplicação do bacilo por interferir na síntese do RNA bacteriano. Acredita-se que seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da incorporação do ácido micólico, essencial para a formação da parede das microbactérias (KHOO, K. H. *et al.*, 1996). É um fármaco considerado eficaz somente contra microbactérias que se dividem ativamente. É rapidamente absorvido (75 a 80%) no trato gastrintestinal logo após a sua administração oral, distribui-se pela maioria dos tecidos e líquidos e é eliminado por via renal, 80% é excretado em 24 horas (SOINI, H. *et al.*, 2001). A figura 1 ilustra o mecanismo de ação dos principais fármacos anti_TB.

Figura 1: Mecanismo de ação dos principais fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.



Fonte: Adaptado de NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases). Google imagem/<http://www.google.imagem.com.br/mecanismo-de-acao-farmacos-anti-tb>.

Esses quatro fármacos (RIF + INH + EMB + PZA) combinados são bastante eficazes no combate ao MTB, sendo chamados de fármacos de primeira escolha ou de primeira linha no tratamento da tuberculose. Apresenta mais vantagens de serem de baixo custo e disponíveis em toda rede de saúde do país de forma gratuita (BRASIL, 2011).

2.4 Mecanismos de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos principais fármacos anti-TB.

A resistência do MTB aos fármacos anti-TB pode ocorrer de forma natural ou influenciada pelo meio. (ZHANG, YEW 2009, BRITO *et al.*, 2004).

No que se refere à resistência natural do MTB a um determinado fármaco, o que se observa é o surgimento de mutações cromossômicas espontânea, geralmente, cerca de uma célula bacteriana resistente em 10^7 a 10^8 células por geração em uma população bacteriana

que não teve contato com medicamentos (CAMPOS, 1999). Já para a resistência natural há múltiplos fármacos, supõe-se que mutações causando resistência concomitante à INH e RMP apresentam uma frequência mutagênica de 1 para cada 10^8 e 10^9 replicações bacterianas, respectivamente. Dessa forma, acredita-se que, para que se tenha o surgimento de uma cepa de MTB naturalmente resistente a múltiplas drogas a probabilidade desse fato ocorrer será de aproximadamente de 1 para cada 10^{14-16} divisões celulares (MARTILLA e SOINI, 2003; GILLESPIE, 2002).

Pesquisadores afirmam que a resistência é um fenômeno fundamentalmente ligado às grandes populações bacterianas e, que, quanto maior a população bacteriana no processo infeccioso, maior a chance de haver bacilos naturalmente resistentes, antes do início da quimioterapia (MOKROUSOV, 2002). Sobre tudo, estudos também afirmam que em uma população bacteriana, mutações cromossômicas que resultam em resistência natural aos fármacos anti-TB ocorrem em uma frequência relativamente baixa (CHIANG, C. Y. *et al.*, 2010; DAVI, H. L., 1970).

O fato é que bacilos naturalmente resistentes aos fármacos anti-TB não pré-determina resistência, mas sim a seleção das cepas resistentes, (TELENTI, 1997; MARTILLA e SOINI, 2003; CHIANG *et al.*, 2010). A taxa da população bacteriana naturalmente resistente para as principais drogas anti-TB, estão ilustradas no quadro 1.

Quadro 1: Frequência dos mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* naturalmente resistentes aos fármacos em meio de cultura sólido Lowenstein-Jensen (LJ)

Fármaco	Concentração LJ	Frequência de Mutantes Naturalmente Resistente
Rifampicina	40µg/mL	1 mutante resistente para 10^{7-8} bacilos
Isoniazida	0,2µg/mL	1 mutante resistente para 10^{5-6} bacilos
Pirazinamida	25µg/mL	1 mutante resistente para 10^{2-4} bacilos
Estreptomicina	4µg/mL	1 mutante resistente para 10^{5-6} bacilos
Etambutol	2µg/mL	1 mutante resistente para 10^{5-6} bacilos
Ethionamida	2µg/mL	1 mutante resistente para 10^{3-6} bacilos
Rifampicina + Isoniazida*		1 mutante resistente para 10^{12-16} bacilos

Legenda: LJ=meio de cultura lowestein Jensen, µg=micrograma, ml=mililitro:Fonte: Adaptado do Canetti G. *et al.*, 1969, * De Lemos *et al.*,2013.

Quanto à resistência do MTB durante a quimioterapia, alguns autores acreditam que seja influenciada pelo meio, devido à seleção e multiplicação de mutantes resistentes, pré-existentes nas populações das lesões. (CANETI, *et al.*, 1965; HEYM, B., 1994; TELENTI, 1997; MOKROUSOV, 2002; CHIANG, C. Y., 2010). Para esses pesquisadores o que ocorre é somente a destruição “morte” de grande parte dos bacilos sensíveis, no início do tratamento. No decorrer do tratamento, os bacilos mutantes resistentes continuam a crescer, porque não foram afetados pelo fármaco, e se nesse período o indivíduo não fizer a medicação “correta” ou “abandonar” o tratamento a população bacteriana resistente multiplicará na lesão, tornando-se a maioria (CHIANG, C. Y., 2010).

O que se sabe é que em toda a população de bacilos sensíveis existe uma pequena proporção de bacilos resistentes, ou seja, bacilos que sofreram mutações espontâneas. Embora esses bacilos tenham originado de uma única célula eles não apresentam comportamento homogêneo na presença dos diferentes fármacos utilizados no tratamento da TB (GILLESPIE, 2002).

Como conceito, mutações são alterações no material genético que podem ocorrer como um erro durante a duplicação do DNA ou por fatores ambientais. A mutação é uma fonte da variabilidade genética dos organismos vivos. Pode ocorrer em qualquer parte do material genético, sendo, classificadas em “mutações gênicas” que podem levar a perda, inserção, adição ou substituição de bases nitrogenadas em um trecho do DNA e “mutações cromossômicas”, que ocasionam mudanças no número ou na estrutura do cromossomo. (SANTOS, V. S., 2019).

O MTB, ao longo de sua evolução, desenvolveu diferentes mecanismos de resistência aos fármacos anti-TB. O que se acredita até o momento é que esses mecanismos de resistência são exclusivamente mutações, não há indicação de resistência associada à transferência por plasmídeos ou transposons (HEYM, B., 1994).

Estudos afirmam que as mutações ou erro de replicação cromossômica ocorrem em genes específicos, que codificam o alvo ou metabólitos de um fármaco (ROSSETI, 2002). A resistência à RIF, por exemplo, é causada, em sua maioria (97%), por mutações pontuais localizadas na região determinante de resistência à rifampicina (RRDR) de 81pb do gene *rpoB* do MTB, responsável por codificar a cadeia β da RNA polimerase (MOKROUSOV, 2003; YANG, 2005). Entretanto, estudos também demonstram que algumas cepas de MTB podem apresentar diferentes níveis de resistência a um determinado fármaco e não estar diretamente relacionada a mudança em seu gene alvo (RAMASWAMY S. MUSSER, 1998;

ESPINAL *et al.*, 2001; SIU, *et al.*, 2011; ZAW M. T., *et al.*, 2018), além disso, mutações “fora” da RRDR podem estar relacionadas a resistência a esse fármaco (WILLIAMS, *et al.*, 1994; ESPINAL *et al.*, 2001).

Ao contrário da resistência à RIF, a resistência à INH é mais complexa, esta pode ocorrer de formar a modificar a proteína ou enzima de ligação do fármaco, codificada por diferentes genes como *katG*, *inhA*, *kasA* e *ahpC*. Uma mutação no gene *inhA* pode modificar a enzima catalase, que perde afinidade pelo NADH, resultando em resistência a esse fármaco por exemplo (SLAYDEN; LEE; BARRY, 2000). Mutações no gene *katG*, levam a substituição do aminoácido serina (AGC) por treonina (ACC), gerando uma diminuição da ação da catalase que resulta em resistência para INH (EVANS *et al.*, 2008; WILLIAMS, *et al.*; 1994; HEEP, *et al.*, 2001).

No que diz respeito ao EMB, a resistência a esse fármaco, supõem-se estar associada a alterações na proteína EmbB codificada pelo gene *embB* e/ou no *embC*, em 70% e 60% dos casos, respectivamente. São também encontradas mutações em múltiplos códons desses genes que resultam em dois, três ou quatro aminoácidos diferentes nessa proteína. A mutação associada à resistência a esse fármaco altera o alvo do EMB (SAFI, H. *et al.*, 2008; WOLUCKA, B. A. *et al.*, 2008), entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos utilizados pelo MTB para aquisição de resistência a esse fármaco (TELENTI, *et al.*, 1997; RAMASWAMY, S. *et al.*, 2000; GIOVANNA RICCARDI, *et al.*, 2009).

Quanto a PZA, mais de 70% dos isolados de MTB resistentes a esse fármaco apresentaram mutações no gene *pncA*, que codifica a enzima pirazinamidase, a qual converte o fármaco PZA em sua forma ativa (MESTDAGH *et al.*, 1999). Acredita-se que várias mutações encontradas nesse gene estão associadas a uma pirazinamidase ineficiente (MORLOCK, *et al.*, 2000).

2.5 A resistência aos fármacos anti-TB no Brasil

A resistência aos fármacos anti-TB não é um fenômeno recente, globalmente, estudos já alertavam para essa possibilidade logo após a inserção dos primeiros fármacos anti-TB (FUJIWARA, P., 1997; ZANG, Y., 1994). Os primeiros estudos de investigação de resistência, realizado no Reino Unido, por exemplo, já revelavam a existência da resistência primária aos fármacos estreptomicina (SM) e INH (MITCHISON, D. A., 1986). Sobre tudo, em 2010, um estudo realizado em Paris–França afirmou que a resistência primária aos

fármacos anti-TB pode ocorrer naturalmente por mecanismo de mutações genéticas e que a TB-DR não é necessariamente mais virulenta (CHIANG, C. Y., 2010).

No Brasil, a resistência aos fármacos é tão antiga quanto a quimioterapia anti-TB, foi demonstrada logo nos primeiros 5 anos de uso dos esquemas terapêuticos padronizados no país e vem a cada ano atingindo níveis mais altos de resistência aos quimioterápicos utilizados (HISBELLO, S.; CAMPOS, 1999).

Os resultados de dois Inquéritos Nacionais de Resistência aos Fármacos anti-TB realizado no país demonstraram que do primeiro inquérito (1995-1997) para o segundo (2007-2008) houve um crescente aumento nos dados de resistência. Houve um aumento de 4,4% para 6% na resistência primária à INH, de 1,3% para 1,5% na resistência primária à RIF e de 1,1% para 1,0% a multirresistência primária (SANTOS; GALES, 2010). Diante desses resultados, a busca de novas estratégias para conter o espalhamento da TB-DR no país mostra-se necessária.

De acordo com o padrão de resistência dado pelo teste de sensibilidade, a resistência tem a seguinte classificação: monorresistência, caracterizada por apresentar resistência a um único fármaco anti-TB, polirresistência, apresenta resistência a dois ou mais fármacos anti-TB, exceto a associação de RIF e INH, multidrogarresistente apresenta resistência à pelo menos RIF e INH e, por fim, a resistência extensiva, que representam resistência a RIF e INH acrescida da resistência a uma fluoroquinolona e uma droga injetável de segunda linha (AK, KAN ou CAP) (BRASIL, 2011).

No Brasil, em 2016, dos 1.027 casos novos de TB resistente diagnosticados, 476 (46,3%) eram de TB-DR, 442 (43,0%) de TB-MDR, 72 (7,0%) de polirresistência, 8 (0,8%) de TB-XDR e outros 29 (2,8%) com padrão de resistência não definido no momento do diagnóstico (BRASIL, BOLETIM 2017).

Para a OMS a resistência aos fármacos está fortemente associada aos casos de tuberculose previamente tratados, sendo 10 vezes maior a probabilidade de surgirem cepas resistentes neste grupo do que nos casos novos de TB (WHO, 2016). O Programa Nacional de Controle da tuberculose (PNCT) admite que a resistência aos fármacos é um desafio para o sistema de saúde porque há poucos fármacos efetivos disponíveis, além disso, estudos afirmam que uma pessoa infectada por bacilo resistente pode levar a uma doença potencialmente intratável e altamente contagiosa (DALCOLMO, 2007; KRITSKI, 2010).

É pertinente assumir então que, independente do padrão de resistência, a TB-resistente no Brasil precisa ser diagnosticada e tratada o mais precocemente possível.

Lamentavelmente, indivíduos infectados com cepas do MTB resistentes a esses fármacos têm os sintomas da TB agravado seconsequentemente a chance de cura diminuída (WHO, 2016).

Diante do exposto, investigar as mutações associadas à resistência do MTB aos fármacos anti-TB é de grande importância para conter o espalhamento da TB-MDR.

2.6 Diagnósticos da tuberculose resistente aos fármacos

A cultura e o TSA, são os principais recursos utilizados no diagnóstico da TB-DR e TB-MDR no Brasil, sendo considerado “padrão ouro” (BRASIL; MS; SVS; PNCT, 2008/2011).

A cultura é um método fenotípico de elevada sensibilidade e especificidade utilizado no diagnóstico da tuberculose resistente. Ela permite o isolamento e também detecta a multiplicação de bacilos álcool ácido resistente (BAAR), em meios de cultura contendo concentração inibitória mínima (MIC) dos fármacos. Os meios de cultura mais utilizados são o meio LJ e o Ogawa-Kudoh (OgK) sendo ambos a base de ovo. Os meios de cultura são de menor custo e com baixo índice de contaminação, porém, ainda não são realizados em toda rede pública, porque necessitam de infraestrutura laboratorial (BRASIL; MS; SVS; PNCT, 2008/2011).

O TSA permite detectar bacilos resistentes na presença de determinado fármaco. O teste mede a capacidade que certos medicamentos têm de inibir o crescimento das bactérias baseado na concentração crítica e/ou na concentração mínima inibitória determinada para cada fármaco. Se uma bactéria sofre a ação de um antibiótico, estase diz “sensível” (S); se pelo contrário, o antibiótico não exerce qualquer efeito sobre a bactéria estase diz “resistente” (R) (BRASIL; MS; SVS; PNCT, 2008). O resultado do TSA vai auxiliar o médico na escolha dos antibióticos mais eficazes contra o patógeno (BRASIL; MS; SVS; PNCT, 2011).

Diversos métodos laboratoriais, fenotípicos ou genotípicos, podem ser utilizados para medir a sensibilidade “*in vitro*” do MTB aos agentes antimicrobianos dos quais, os principais, são detalhados a seguir.

2.6.1 Principais métodos fenotípicos para detecção da tuberculose resistente

O método das proporções (CANETTI, *et al.*, 1963) e o método automatizado BactecMGIT^R (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) são métodos fenotípicos, baseados em cultura e são também os mais utilizados no Brasil e na maioria dos países para o diagnóstico da TB-DR e TB-MDR (BRASIL; MS; SVS; PNCT, 2011).

Muitas indústrias também apresentam diferentes sistemas e kits de detecção de resistência com base no fenótipo, alguns em fase de avaliação e outros já padronizados e disponíveis (PEI, *et al.*, 2009). Essas metodologias são bastante eficazes (PALOMINO, *et al.*, 2007; JAIN *et al.*, 2011).

2.6.1.1 Método das proporções

O método das proporções, descrito por CANETTI e colaboradores em 1963, permite calcular a proporção de bacilos resistentes e de bacilos sensíveis em uma população de células bacterianas através da semeadura de diluições do inóculo em tubos contendo o meio de cultura L-J sem e com o fármaco na concentração crítica. A concentração crítica de um fármaco é baseada na proporção necessária do fármaco para neutralizar o crescimento do bacilo “*in vitro*”. A concentração crítica determinada para RIF é 40µg/mL, INH 0,2µg/mL, EMB 2µg/ML e SM4µg/mL. Sendo assim, quando a população bacteriana resiste à ação do fármaco com a formação de um número de colônias igual ou maior a 1% da população geral observada no meio de cultura sem o fármaco, esta é considerada resistente para o fármaco que está sendo testado (CANETTI, *et al.*, 1963).

2.6.1.2 Método Bactec MGIT^R

O sistema BactecMGIT^R (do inglês *Mycobacteria GrowthIndicator Tube*) (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) é um sistema automatizado de cultura em meio líquido, que detecta o crescimento do MTB através da detecção de fluorescência. No fundo do tubo, contendo meio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC (ácido oleico, dextrose e catalase) e panta (mistura de antibióticos para evitar contaminação), existe um composto

fluorescente embebido em silicone. Com a diminuição do oxigênio decorrente do crescimento bacteriano, há um aumento da fluorescência que é detectada pelo aparelho. Segue o mesmo formato do método das proporções, entretanto, com uma linha de corte (cut-off) abaixo de 100 bacilos para sensível (S) e acima de 100 bacilos para organismos resistentes (R) ao fármaco. O método é totalmente automatizado e não radiométrico, demonstra desempenho similar ao método das proporções e apresenta tempo médio de detecção do bacilo em 7 (sete) dias. (HANNA, 1999). A técnica já foi validada em diferentes estudos (LOIEZ-DUROCHER, VACHEE; LEMAITRE, 2000; HUANG *et al.*, 2004; KRUUNER, YATES; DROBNIEWSKI, 2006) e aprovada pela ANVISA para os fármacos de primeira linha: SM, INH, RIF e EMB (WHO, 2009; BRASIL; MS; 2010).

São limitações para uma ampla implantação dessa técnica na rede pública o alto custo dos insumos e a necessidade de uma boa estrutura laboratorial com disponibilização de equipamentos para conter o risco biológico elevado do procedimento. Por esta razão, a sua utilização ocorre apenas em centros de referência, universidades e unidades de pesquisa (PALOMINO, 2007; BANADA *et al.*, 2010).

2.6.1.3 Método *Microscopic Observation Direct Susceptibility Assay* (MODS).

O ensaio MODS (do inglês *Microscopic Observation Drug Susceptibility*) é um teste baseado em cultura líquida que detecta MTB e avalia resistência a INH e a RIF diretamente nas amostras de escarro. O método faz uso de duas propriedades importantes do MTB. A primeira propriedade é seu crescimento mais rápido em meio líquido do que em meio sólido e a segunda é sua capacidade de formação do “fator corda” que é observado no crescimento em meio líquido do MTB. O fator corda é um efeito causado pela principal molécula associada ao ácido micólico, a trealose 6,6-dimicolato (TDM), um componente da parede celular das micobactérias que desenvolve um importante mecanismo imunomodulador responsável pela virulência. Nesse caso os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) ficam dispostos em cadeias paralelas serpentiformes ao microscópico semelhantes a uma “corda”. (MONTEIRO, P. H. T. *et al.*, 2003; INDRIGO, J. *et al.*, 2003).

A técnica utiliza um microscópio de luz invertida, uma placa de 24 poços inoculada com a amostra de escarro descontaminado e suspenso em meio Middlebrook 7H9 com e sem o antimicrobiano. A detecção é realizada, em 7 (sete) dias em média e a incorporação da

INH e RIF no teste possibilita a rápida detecção de TB-MDR. (MINION, JAIN, 2010; CHAIYASIRINROJE *et al.*, 2012).

2.6.1.4 Método TSA do Nitratase

O ensaio da nitratase é uma técnica muito simples, baseada na capacidade do MTB em reduzir o nitrato incorporado ao meio de cultura, a nitrito e que é detectado pela adição do reagente de Griess. No método TSA nitratase O MTB é cultivado na presença ou ausência de um antibiótico e sua habilidade de reduzir nitrato é medida após 10 dias de incubação no meio de cultura. Cepas resistentes vão reduzir o nitrato a nitrito, que é revelado por uma coloração roxa (ANGEBY, KLINTZ; HOFFNER, 2002).

2.6.1.5. Análise da amplificação de micobacteriófagos.

São ensaios para detecção de resistência do MTB baseado no crescimento bacteriano em placas inoculadas com vírus amplificado ou através expressão de genes relatores (PALOMINO, 2006).

No kit comercial FASTPlaqueTB (Biotec Laboratories Ltda, Ipswich, United Kingdom), por exemplo, os bacilos de MTB são infectados por micobacteriófagos D29 e depois inoculados em meio de cultura sólido, contendo antibiótico a ser testado. Em seguida, inocula-se em toda a superfície do meio uma suspensão de *Mycobacterium Smegmatis* (*M. Smegmatis*) micobactéria de crescimento rápido. Caso a cepa de MTB seja sensível ao antibiótico em teste, o micobacteriófago não será replicado e o *M. Smegmatis* crescerá por todo o meio de cultura, formando um tapete. Entretanto, se a cepa for resistente, os bacilos de MTB estarão metabolicamente ativos, o vírus será replicado, sobretudo, provocará a lise das células do MTB e infectarão o *M. Smegmatis* que também será “lisado”, fazendo com que o crescimento no meio de cultura seja irregular, formando buracos (ou placas) no tapete bacteriano (JAIN *et al.*, 2011; RONDON *et al.*, 2011). A técnica é considerada um método menos sensível na detecção do MTB resistente comparado a outras tecnologias de amplificação de fagos (MUZAFFAR, R. *et al.*, 2002; ALERT, H. *et al.*, 2004).

2.6.2 Principais métodos genotípicos ou moleculares para detecção da tuberculose resistente.

Durante as últimas décadas, alguns métodos genotípicos e moleculares foram desenvolvidos com diferentes propostas para testes de diagnóstico da TB-DR. O principal objetivo dessas metodologias é a detecção rápida do agente causador da TB e seu perfil de resistência. Tais metodologias pesquisam por mutações no genoma bacteriano que possam conferir resistência a determinado fármaco (HILLEMANN, *et al.*, 2007; BOEHME, C. C., *et al.*, 2010; JAIN *et al.*, 2011). Entre essas técnicas destacam-se: análise por sonda genética, análise da PCR e o sequenciamento de DNA.

2.6.2.1 Análise por sonda genética

O teste INNO-LIPA RIF/TB (Innogenetics NV, Ghent, Belgium) e o genotype MTB DRplus (Hain Lifescience, Nehren, Germany) são dois testes comerciais disponíveis para detectar TB-MDR. Ambos incluem sondas genéticas específicas para o MTB e para a região determinante de resistência a RIF (RRDR) no gene *rpoB* e um número de sondas selvagens (WT) sendo que o genotype MTB-DRplus também detecta resistência a INH (DE BEENHOUWVER, H. *et al.*, 1995).

Em uma revisão sistemática foi reportado que o teste INNO-LIPA tem sensibilidade alta, entre 82% e 100% e especificidade de 92% a 100% na determinação da resistência a RIF em cepas de TB-MDR (MORGAN, M. *et al.*, 2005). Já para o teste genotype MTB-DRplus, estudos têm demonstrado uma sensibilidade de 89% a 91% na detecção de cepas TB-MDR (EVANS, *et al.*, 2008; HILLEMANN, *et al.*, 2007; TESSEMA, *et al.*, 2012). Esses testes, INNO-LIPA RIF/TB e o genotype MTB DRplus apresentam a vantagem do tempo de realização de aproximadamente 24 a 48 horas para liberação do resultado, porém com desvantagem do custo elevado (DE BEENHOUWER, *et al.*, 1995; ROSSAU *et al.*, 1997).

2.6.2.2 Análise de reação em cadeia da polimerase

A descoberta do DNA, em 1953, por Francis Crick, James Watson e Maurice Wilkins, abriu uma nova era para a ciência e contribuiu para o surgimento da biologia molecular. (Watson, J. D., 1953). Avanços na biologia molecular levaram ao

desenvolvimento da técnica da Reação em cadeia da Polimerase do Inglês, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) por Kary Banks Mullis, em abril de 1983. A PCR é uma técnica de amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, em que, moléculas de DNA são amplificadas milhares ou milhões de vezes de forma bastante rápida durante diferentes ciclos térmicos. Todo o procedimento é realizado *in vitro*, gerando DNA em quantidade suficiente para análises posteriores (SAIKI *et al.*, 1988).

A PCR tem sido amplamente utilizada, em diferentes áreas no campo da pesquisa científica. Em escala global, os métodos de diagnóstico baseados em PCR para detecção da TB-DR e TB-MDR também vêm sendo testados, avaliados e aplicados em sistemas automatizados, a fim de reduzir o tempo de diagnóstico da tuberculose resistente (VICTOR; VAN HELDEN, 2001). Dentre as técnicas baseadas na PCR se destacam o sequenciamento de DNA, a PCR em tempo real, a Nested-PCR e a PCR multiplex.

2.6.2.2a Sequenciamento do DNA

O sequenciamento de DNA é considerado a metodologia “padrão-ouro” entre as análises moleculares. É uma ferramenta automatizada que tem uma boa acurácia na análise de mutações em genes que conferem resistência aos fármacos anti-TB (SANGER, 1997; VICTOR; VAN HELDEN, 2001). A ampliação da tecnologia para Sequenciamento do Genoma Completo (WGS) vem possibilitando o maior entendimento das mutações já conhecidas e também identificando possíveis novas mutações gênicas envolvidas na resistência do MTB (SOINI; MUSSER, 2001; A. M. CARIIBBE, 2016).

A desvantagem do sequenciamento de DNA é a dificuldade da técnica de ser implementada em uma rotina laboratorial, porque envolve várias etapas de reações, necessita de um profissional qualificado e, além disso, necessita de equipamentos e software específicos, o que torna o custo muito alto para os laboratórios públicos. Entretanto, tem sido amplamente usado nos laboratórios de pesquisa e espera-se que com o WGS a tecnologia resulte em um menor custo para que possa ser utilizada na rede de saúde pública (HAZBON, 2004).

2.6.2.2b PCR em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real (do inglês *Real Time Quantitative PCR- qPCR*) é uma variação da técnica de PCR que permite a amplificação e detecção simultaneamente de diferentes gens alvos e também alvo único. O resultado é visualizado em tempo real durante a amplificação da sequência de interesse, com a capacidade ainda de gerar resultados quantitativos com maior precisão. Durante a amplificação, a quantificação é determinada pela quantidade de produto amplificado durante cada ciclo através da fluorescência emitida (SAUNDERS, N. A., 2004). Este método utiliza um equipamento com sistema de monitoramento da emissão da fluorescência presente no corante de reação de PCR (Sybrgreen) que se liga ao produto genético amplificado permitindo acompanhar a amplificação em tempo real. A metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados, diminuindo o risco de contaminação da amostra e dando maior precisão ao teste (MACKAY, *et al.*, 2004).

O sistema Gene Xpert MTB/Rif® aplica a tecnologia da PCR em tempo real de uma forma totalmente automatizada, ou seja, há uma integração da lise do microorganismo, da reação da PCR, purificação e amplificação de ácidos nucleicos de maneira automatizada e da detecção de sequência específica do MTB. O sistema permite detectar a presença do bacilo causador da TB e também identificar a resistência à rifampicina, um dos principais medicamentos usados no tratamento da doença (DUROVNI *et al.*, 2014). É um sistema padronizado e recomendado pela OMS como teste rápido molecular (TRM) nos laboratórios clínicos (WHO, 2011).

A maior vantagem do GeneXpert MTB/Rif® é a rapidez devido ao uso direto da amostra de escarro, ou seja, sem a necessidade de cultivo. Além disso, o sistema tem baixo risco de contaminação (BANADA, P. P. *et al.*, 2010). A principal desvantagem é que o equipamento e seus insumos (cartuchos e reagentes) ainda tem custo alto para o SUS (VADWAIL, V. *et al.*, 2011).

2.6.2.2c Nested-PCR

A Nested-PCR é uma variante da PCR convencional, a técnica envolve dois conjuntos de iniciadores usados em duas reações sucessivas de PCR. O segundo conjunto de iniciadores destina-se a amplificar um alvo secundário dentro do primeiro produto processado. Na prática é uma reamplificação do produto da PCR, (KOX, L. F., 1994). É um ensaio útil para amplificar amostras pobres, por exemplo, casos de TB extrapulmonar e TB em crianças cujas amostras tem pouco bacilo ou seja, são paucibacilares (PIERRE C, 1996; GOMEZ-PASTRANA D, *et al.*, 1999; PORTILLO-GÓMEZ, L., 2000; LIMA, K.V. *et al.*, 2007).

2.6.2.2d PCR-Multiplex

A técnica também é uma variação da PCR, que permite amplificar várias sequências diferentes de DNA em diferentes genes alvos, utilizando múltiplos iniciadores em uma única reação de PCR (YANG, Z., 2005). É uma técnica bastante promissora para o diagnóstico da TB-DR e TB-MDR principalmente em países em desenvolvimento. (GUPTA, A. *et al.*, 2013).

Mokrousov e colaboradores (2003) foram os primeiros a adaptar a técnica de PCR-Multiplex para detecção de múltiplos alelos específicos (MAS-PCR) em genes associados à resistência aos fármacos anti-TB. O quadro 2 mostra os diferentes estudos que demonstram que a técnica, MAS-PCR pode ser uma boa ferramenta para o diagnóstico da TB-DR e TB-MDR.

Quadro 2: Principais estudos que propõem o MAS-PCR como uma boa ferramenta de diagnóstico da TB resistente, Multirresistente e Extensivamente resistente.

AUTOR E ANO	CATEGORIZAÇÃO	PALAVRA CHAVE	CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA
Mokrousov I <i>et al.</i> 2003 Herrera-Léon L, <i>et al.</i> , 2004. Bing-Shao Chia <i>et al.</i> , 2012. Imperiale B. R. <i>et al.</i> , 2013.	Padronizaram e otimizaram a técnica MAS-PCR para detecção simultânea das mutações pontuais em genes associados a resistência aos principais fármacos	MAS-PCR and rapid Diagnostic and multidrug-resistant Tuberculosis	Propõe a MAS-PCR como uma ferramenta simples, rápida e barata na detecção de TB-MDR. Sugerem a MAS-PCR como teste de diagnóstico rápido, podendo ser aplicada no diagnóstico de rotina como ferramenta auxiliar.
Chowdhury <i>et al.</i> , 2012. Gupta A. <i>et al.</i> , 2013 Majumdar, T. 2015.	Compararam a sensibilidade e especificidade da MAS-PCR e outras metodologias (padrão ouro).	MAS_PCR , Tuberculosis resistant	Alguns desses estudos apontam a metodologia como um teste eficiente no diagnóstico da TB-MDR.
Siu <i>et al.</i> , 2011. Mistri, <i>et al.</i> 2016	Avaliação e aplicação do MAS-PCR na detecção do MTB resistente direto de amostras de escarro.	MAS-PCR and rapid Diagnostic and multidrug-resistant	A técnica tem demonstrado ser uma ferramenta promissora no diagnóstico da TB resistente Demonstra ser útil principalmente em países com pouco recurso cuja cultura não é possível.
Dorothy Yeboah-Manu <i>et al.</i> 2001 Savita Kullkarni <i>et al.</i> 2012 Ravibalan Thirumurugan <i>et al.</i> 2015 Ankush Raj <i>et al.</i> 2016	Utilização do MAS-PCR na identificação de cepas do complexo MTB e MNT.	MAS-PCR diagnostic Tuberculosis and MNT	Podendo ser utilizada na detecção de diferentes genes-alvo para auxiliar na diferenciação e caracterização das cepas do complexo <i>M.tuberculosis</i> simultaneamente.

Leg: *etal.*= colaboradores; RIF = rifampicina; INH=Isoniazida; MTB= *mycobacteriumtuberculosis*, MNT=*mycobacterias Não tuberculosis*, MAS_PCR Reação em cadeia da polimerase de múltiplos Alelos específico.

Fonte: de pesquisabase de dados: Portal Periódicos Capes, PubMed e SVS.

2.7 Importância de avaliar mutações e as suas frequências no diagnóstico da tuberculose resistente

O conhecimento de que a resistência aos fármacos pode ocorrer por diferentes situações e por diferentes mecanismos do MTB, tem sido investigado amplamente e comprovado em diferentes estudos (TELENTI *et al.*, 1993; ZHANG & TELENTI, 2003; TAKIFF, 2000; RISK A *et al.*, 2000). Avanços no entendimento do genoma do MTB também vêm contribuindo para uma melhor compreensão das mutações relacionadas à resistência aos fármacos anti-TB e ao desenvolvimento de novas ferramentas para auxiliar o diagnóstico da TB (SHARANA MAHOMED, 2017; SEYED HASNAIN, 2015).

Atualmente, a comunidade científica, já sabe que a resistência à RIF está relacionada, em sua grande maioria (95-97%), a mutações pontuais ocorridas no sítio de ligação desse fármaco, conhecido como região determinante de resistência a rifampicina (RDRR) ou região de 81pb do gene *rpoB* (MOKROUSOV, I *et al.*, 2003). No que diz respeito à resistência a INH, diferentes genes estão associados à resistência a esse fármaco, sobretudo mutações no gene *katG* ocorre com uma frequência de 80% no códon 315 (MOKROUSOV, 2003; CHIA *et al.*, 2012).

Uma revisão sistemática se mostrou que a frequência de mutações associadas à resistência à RIF e INH varia geograficamente. Na Europa, por exemplo, mutações no gene *katG* ocorrem com uma frequência de 69% já nas Américas a frequência é de 61%. Na Guiné Equatorial, menos de 10% dos isolados resistentes à INH tem mutação no gene *katG*, mas em 80,5% a mutação é no gene *mab-inhA* (MARVA SEIFERT *et al.*, 2015). No que diz respeito à resistência a RIF, no Paquistão, no estudo de KHAN e colaboradores (2013) a frequência de mutações no códon 531 do gene *rpoB* foi de 54,5%, já na China mutação nesse códon ocorre em uma frequência considerada baixa em torno de 27,7% (YUE *et al.*, 2003). No sul da Índia no estudo de Thirumurugan e colaboradores, 2015 a frequência das mutações nos códons 531, 526 e 516 do gene *rpoB* foi de 54,4%, 18,9% e 55,6% respectivamente.

Alguns autores também relatam que a frequência de mutações no gene *rpoB* e *katG* associadas a resistência à RIF e INH podem também variar em diferentes regiões de um país, principalmente em países com alta incidência da doença. Na África, por exemplo, a frequência de fenótipos resistentes à INH com mutação no gene *katG* é de 73,5 % no códon 315 e de 17,1% na região promotora *inhA-15* (MARVA; SEIFERT *et al.*, 2015), entretanto, no Kwazulu Natal, Sul da África a frequência de mutações no códon 315 do gene *katG* é de 100% nos isolados de MTB resistentes a INH (KIEPIELA *et al.*, 2000).

No Brasil, o cenário TB-DR também tem características especiais de padrão de resistência aos fármacos RIF e INH, nas diferentes regiões do país (FREITAS, *et al.*, 2014; FERIZZOLO *et al.*, 2012). Em um estudo realizado em Goiás, Centro Oeste do Brasil, por exemplo, 13,6% dos casos novos de TB tinham resistência à RIF ou a INH e 6,7% tinham resistência múltipla (RIF + INH). A frequência de multirresistência nesse estudo foi considerada alta, entretanto, a prevalência de mutações no códon 315 do gene *katG* foi considerada baixa (41%) comparada a outros estudos conduzidos no país (SANTOS, L. C. *et al.*, 2010).

Diante desses fatos, diferenças fenotípica e genotípicas no padrão de resistência entre os casos de TB-MDR nas diferentes regiões do Brasil, devem ser levadas em consideração principalmente no desenvolvimento de estratégias de vigilância e de novos métodos de diagnósticos da TB resistente no país (HAAS *et al.*, 1997; CAVUSOGLU, C. *et al.*, 2006).

Nos quadros 4 e 5 estão o resumo dos principais estudos que contribuíram para o conhecimento da TB-DR e da frequência das mutações relacionadas a resistência a RIF e INH no Brasil.

Quadro 3: Principais estudos que contribuíram para o conhecimento das bases moleculares da resistência do *Mycobacterium tuberculosis*.

AUTOR E ANO	CATEGORIZAÇÃO	PALAVRA CHAVE	CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA
Zhang Y <i>et al.</i> , 1992. Telenti <i>et al.</i> , 1993. Ramawamy, S. <i>et al.</i> , 1998 Heym. B; <i>et al.</i> , 1999. Riska P. F. <i>et al.</i> , 2000.	*Pioneiros na descrição dos principais alvos genéticos moleculares (marcadores), para detecção de cepas de MTB resistente.	Mutations and -Resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and mechanisms of resistance.	Esses estudos contribuíram para o melhor entendimento dos principais mecanismos de resistência do MTB e também possibilitaram o surgimento e desenvolvimento de novas tecnologias, testes e Kits de diagnóstico para TB
Abate G. <i>et al.</i> , 2001. Mokrousov <i>et al.</i> , 2002. Martilla e Soini, 2003. Laurenzo D <i>et al.</i> , 2011.	*Caracterizaram as bases genéticas e os mecanismos moleculares da resistência no MTB. * e INH.	Mutations, <i>rpoB</i> , <i>KatG</i> and MTB	Determinaram a frequência e prevalência das principais mutações nos genes <i>rpoB</i> e <i>KatG</i> associadas à resistência a RIF

Leg: *etal.* = colaboradores; RIF = rifampicina; INH=Isoniazida; MTB= *mycobacteriumtuberculosis*.

Fonte: pesquisa base de dados: Portal Periódicos Capes, PubMed e SVS.

Quadro 4: Principais estudos nacionais que contribuíram para a caracterização e frequência das principais mutações associadas à resistência do *Mycobacterium tuberculosis* a rifamicina e isoniazida nos genes *rpoB* e *katG*, respectivamente.

AUTOR E ANO	CATEGORIZAÇÃO	PALAVRA CHAVE	CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA
Rossetti <i>et al.</i> , 2002. Valim A. R. M <i>et al.</i> , 2002. Cardoso R. F <i>et al.</i> , 2004. Siqueira H. R <i>et al.</i> , 2009. Coelho, M, B <i>et al.</i> , 2011. De Freitas, F. A <i>et al.</i> , 2014.	*Determinaram a frequência e prevalência das principais mutações pontuais nos genes <i>rpoB</i> e <i>katG</i> em cepas de <i>M. tuberculosis</i> resistentes isolados no Brasil.	Mutations <i>rpoB</i> and <i>KatG</i> <i>Tuberculosis</i> and Brazil Tuberculosis Isoniazid Rifampin and resistance Brazil	Estudos nacionais que ajudaram na caracterização do perfil de resistência do MTB circulante no país e na determinação da frequência das principais mutações associadas a resistência a RIF e INH.

Leg: *et al.* = colaboradores; RIF=rifamicina; INH=isoniazida; MTB=*mycobacterium tuberculosis*
Fonte de pesquisa base de dados: Portal Periódicos Capes, PubMed e SVS.

Avaliar novas ferramentas de diagnóstico da TB-DR com base nas principais mutações relacionadas a resistência do MTB aos fármacos é de grande relevância. Este trabalho se propõe a avaliar a performance do método MAS_PCR no diagnóstico rápido de casos de tuberculose sensível, resistente e multirresistente aos fármacos em cepas do MTB estocadas no banco de cepas do laboratório do Centro de Referência Professor Hélio Fraga.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a utilização do método MAS-PCR (*Multiplex allele-specific-PCR*) na detecção de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensível, resistente e multirresistentes estocados no banco de cepas do Centro de Referência Professor Hélio Fraga no período de 1996-2007.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência do método MAS-PCR (*Multiplex allele-specific-PCR*) quando comparado aos resultados obtidos pelo método automatizado MGIT 960 (Bacton Dickinson-USA) e pelo sequenciamento de DNA no diagnóstico da tuberculose multidroga resistente.
- Determinar a frequência de mutações nos genes *rpoB*, *katG* e da região promotora *inhA-15* de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à rifampicina e isoniazida no CRPHF.
- Avaliar a detecção simultânea das principais mutações dos genes *rpoB*, *katG* e região promotora do gene *inhA*, que conferem resistência à rifampicina e isoniazida, respectivamente, através do método MAS-PCR em cepas do *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Estudo laboratorial do tipo experimental retrospectivo para avaliar uma técnica molecular baseada na reação em cadeia da polimerase de múltiplos alelos específicos (MAS-PCR) na detecção de mutações associadas à resistência a RIF e INH em culturas do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) sensível, resistente e multirresistente aos fármacos do Laboratório de Referência Nacional em Bacteriologia da Tuberculose Ângela Werneck do Centro de Referência Professor Hélio Fraga (LRNBT-CRPHF/ENSP/FIOCRUZ).

4.2 Amostras

Amostras de conveniência de cultura estocadas no banco de cepas do LRNBT foram selecionadas para o estudo. O cálculo amostral estimado foi de 139 amostras, considerando os seguintes dados: erro amostral de 5%, intervalo de confiança de 95%, percentual máximo de 10% do estoque com base na calculadora online disponível em: <https://praticaclinica.com.br/anexos/ccolaborativa-calculo-amostal/ccolaborativa-calculo-amostal.php>.



A seleção das 139 culturas para o estudo foi realizada de forma aleatória e por sorteio com ajuda do aplicativo WWW.winepi.net/winipi2 utilizando uma planilha excel^R. Uma cepa padrão H37RV (ATCC 27294) do MTB foi utilizado como referência para perfil sensível aos fármacos e uma cepa padrão (ATCC9096) com resistência simultânea para RIF e INH foi utilizada como referência para perfil de múltiplaresistência.

4.3 Banco de cepas

Uma planilha do Software Excel^R foi criada e organizada anteriormente pela equipe do Laboratório do CRPHF, para o registro de todas as cepas pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) estocadas, após os procedimentos de diagnóstico e identificação do CMTB. Esse banco possui mais de 15.000 cepas que foram estocadas em freezer-70° nos últimos 25 anos, no LRNBT/CRPHF-ENSP/FIOCRUZ.

As amostras são armazenadas diariamente em caixa enumeradas para criotubo e cadastradas na planilha. A planilha Excel^R consistem das seguintes informações: Nas linhas 1 a 10 e nas colunas de **A á J** são registradas a ordem e a posição das amostras estocadas em caixa de criotubos. Cada caixa permite estocar um total de 100 amostras e cada caixa recebe uma numeração específica. O quadro 5 ilustra o modelo da planilha de estoque de criotubo do banco de cepas do laboratório do CRPHF.

Quadro 5: Modelo da Planilha do Estoque do banco de cepas do laboratório do CRPHF/ENSP/Fiocruz

 Banco de cepas do Laboratorio de bacteriologia datuberculosedo CRPHF/ENSP/Fiocruz  Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , MDR, XDR, R ou Sensíveis. Data ___/___/___ Caixa N _____ FREEZER _____										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A										
B										
C										
D										
E										
F										
G										
H										
I										
J										

Fonte: Planilha Excel do controle de estoque do laboratório do CRPHF.

4.4 Plano de recrutamento

Após a seleção aleatóriadas cepas armazenadas em freezer -70 °C por sorteio, conforme descrito anteriormente, as cepas foram aliquotadas em criotubos com rosca e submetidas à extração de DNA. As cepas que apresentaram boa qualidade na extração de DNA foram incluídas no estudo. O Sistema de Gerenciamento do Ambiente Laboratorial–

GAL(<https://gal.fiocruz.sus.gov.br/>) foi utilizado para buscar padrão de resistência para os fármacos RIF e INH dos isolados incluídos no estudo após serem submetidos as metodologias proposta (Figura 2).

Figura 2: Apresentação online do software do Sistema de Gerenciamento do Ambiente Laboratório (GAL)



Fonte:<https://gal.fiocruz.sus.gov.br/CRPHF>.

4.5 Extração de DNA a partir do estoque de cultivo

De acordo com procedimento operacional padrão (POP) do CRPHF, após a retirada do criotubo do banco de cepas, os mesmos foram imediatamente colocados em recipiente com gelo e álcool a 70% por 30 minutos e armazenado em freezer a -20°C por uma noite. Em seguida, os criotubos foram acondicionados a -4°C por 1 hora e depois colocados em isopor com gelo por 15 minutos.

Na cabine de segurança biológica, $100\mu\text{l}$ do inóculo foram transferidos para outro tubo de rosca (1.5ml) com $500\mu\text{l}$ de água estéril, agitados com auxílio do vórtex por 30 segundos, seguidos por uma centrifugação a $13.000\times g$ por 10 minutos. Após centrifugação, os tubos foram colocados em banho-maria a 100°C por 10 minutos para inativação do bacilo. As amostras foram armazenadas a 4°C para posterior extração do DNA. O protocolo

de extração de DNA utilizado nesse estudo foi desenvolvido em nosso laboratório por Campos e colaboradores, (2012).

Após a inativação, foram adicionadas as culturas: 300µl de triton X-100 a 1%, a mistura foi agitada no vórtex por 1 minuto e incubada a temperatura ambiente por 8 minutos. Após essa incubação, 150µl do volume foram transferidos para outro tubo com 100µl de tampão de lise (15% Chelex 100, 0,5% Tween 20 e Tris-EDTA). O tubo foi aquecido a 100 °C por 20 minutos agitado por 1 minuto, utilizando o vórtex seguido por uma centrifugação de 13.000xg por 8 minutos. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo e estocado a 4°C.

O sobrenadante foi usado para as técnicas de MAS-PCR e sequenciamento de DNA. Para a execução dessas técnicas foi necessário uma concentração de 20 a 100ng de DNA estimado previamente em gel de agarose.

4.6 Eletroforese após extração do DNA

Para verificação da integridade do DNA extraído, uma alíquota de 5µL do mesmo, foi aplicado em gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich Co, São Paulo, Brasil) acrescido do corante de corrida gelRed® (PAGE GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain). O DNA foi submetido a uma corrente de 90V em uma cuba de eletroforese com 200mL de tampão TBE 1X ([Tris-borato-EDTA; 0,90mM Tris-HCl, ácido bórico 0,90mM, EDTA 5mM (pH 8,0), por 20 minutos. Para cada corrida de eletroforese foi colocado uma amostra com concentração de DNA conhecida (20ng/100ng) como controle. Após a corrida, o gel foi fotografado em foto-documentador da marca Kodak Digital (*Science Electrophoresis Documentation Analysis System-EDAS120*), empregando luz ultravioleta (UV).

4.7 Teste de Sensibilidade Fenotípico – TSA-MGIT960^R

O teste de sensibilidade fenotípico utilizado foi o método automatizado BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton, Dickson and Company, Maryland, USA) de acordo com o manual de procedimentos da Becton & Dickson (BD). Foi utilizado o KIT- SIRE contendo as drogas

SM, INH, RIF e EMB nas seguintes concentrações: 0.1 µg/ml, e 1.0 µg/ml 5.0 µg/ml e 1,0µg/mL respectivamente. Um tubo contendo o meio de crescimento com ausência dos antibióticos SIRE foi utilizado como controle do teste. Os resultados retrospectivos do teste Bactec MGIT 960^R para os fármacos RIF e INH dos isolados selecionados para o presente estudo foram adquiridos no sistema de gerenciamento laboratorial (GAL).

4.8 Teste Genotípico para detecção de mutações nos genes de resistência- Sequenciamento de DNA.

Para determinar os mutantes resistentes a RIF e INH foi utilizado o protocolo de sequenciamento de DNA descrito por (SANGER, 1997) para os seguintes alvos *rpoB*, *katG* e região promotora *mab-inhA*-15. Um fragmento de 435pb do gene *katG* (códon 224 ao 370), 885pb do gene *inhA*, incluindo 648pb da região promotora *mabA-inhA* (que estende a 271 a 377pb do gene estrutural *mabA*, que também tem sido associado a resistência a INH) e, finalmente, 250pb do gene *rpoB*, incluindo a região RDRR de 81pb (entre os códons 509-533) foram amplificados. A reação inclui a combinação dos primers *katG*O-F/*katG*4-R, *inhA*-F/*inhA*-R e *por* BRO-F/*rpoB*R1-R seguido com adição de 12,5µl da AmpliTaq Gold Master Mix (ABI, USA). A concentração utilizada de cada primer foi de 25pmole 0,2µg de DNA para um volume final de 50µl. A sequência dos primers alvos e as condições da reação de sequenciamento estão ilustradas no quadro 6 e 7.

Quadro 6: Iniciadores (Primers) para os gens alvos *rpoB* *katG* e *mab-inhA* utilizados no sequenciamento de DNA nesse estudo

Sequencia dos iniciadores (primers)	Conc.de uso	Tam. Fragn	Gene alvo	Fármaco
ROF ^a 5' GTCGCCGCGATCAAGGA 3' RIR ^a 5' TGACCCGCGCGTACA 3'	25pmol/μL	250pb	<i>rpoB</i>	Rifampicina (RIF)
katGOF ^a GCAGATGGGGCTGATCTACG katG4R ^a AACGGTCCGGGATGGTG	25pmol/μL	435pb	<i>katG</i>	Isoniazida (INH)
inhAF GTATGGGCCACTGACACAACAC inhAR CCGCCGAACGACAGCAGCAGGA	25pmol/μL	885pb	<i>mab-inhA</i>	Isoniazida (INH)

Legenda:R= reverse, F= foward, T=Timina, A=Adenina, C=Citosina, G=Guanina, pb=pares de base
Prime adaptados do estudo de Mokrousov *et al.*, 2002, 2003).^a e primier adaptado de Yang et al 2005.

A reação de amplificação para o gene *katG* foi realizada em termociclador nas seguintes condições: uma desnaturação a 96°C por 3 min seguida da amplificação do produto realizada em 25 ciclos (de acordo com o protocolo padronizado) composto de desnaturação do DNA a 95°C por 50s, anelamento dos iniciadores a 68°C por 40s ea extensão das novas cadeias à 72°C por 1 min. Ao final dos ciclos seguiu-se um aquecimento a 72°C por 10 min para extensão final e temperatura de manutenção de 4°C até a retirada do produto.

Para o gene *inhA* e região promotora *mab-inhA* a desnaturação foi realizada a 94°C por 3 min e a amplificação foi realizada em 26 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30s, anelamento a 65°C por 40s e extensão a 72°C por 20s. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos seguido de manutenção a 4°C ao final dos ciclos.

Para o gene *rpoB* a desnaturação inicial foi realizada a 96°C por 3min, a amplificação por uma sequência de 30 ciclos, composto de desnaturação a 95°C por 50s, anelamento a 65°C por 40s e extensão a 72°C por 20s. A extensão final foi realizada a 72°C por 3 minutos seguido de temperatura de manutenção a 4°C até a retirada do produto do equipamento. (Quadro 7)

Para confirmação da amplificação, 10μl dos produtos investigados foram aplicados em gel de agarose a 2% com tampão TBE 1X e Gel Red®. Submetidos a eletroforese a 90V por 2 horas em cuba horizontal com tampão TBE 1X Um marcador de 50pb DNA Ladder (BioLabs®) foi utilizado. Ao final da eletroforese os géis foram visualizados capturados e documentados utilizando o sistema de captura de imagem Alpha Imager EC (Alpha Innotech®).

Dando prosseguimento, após avaliar a qualidade do produto amplificado dos gens alvos, a etapa seguinte foi a purificação do produto amplificado utilizando KIT CELLCO (Gel/PCR Purification KIT). De acordo com a recomendação do fabricante 250µl de tampão + 50µl do produto amplificado foi colocado em coluna (tubo coletor de 2mL). Centrifugado a 10.000g ou 9.980 rpm por 30s. Após centrifugação o que passou pela coluna foi descartado. 700 µl do tampão “Washing” foi adicionado na coluna e novamente centrifugado e descartado o que passou pela coluna. Em seguida foi adicionado na coluna com tubo coletor 30-50µl de tampão “Elution” e deixado por 1 minuto em temperatura ambiente. Em seguida centrifugar por 1 minuto.

A precipitação com etanol 70% foi realizada de acordo com Protocolo Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing, (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com algumas modificações. A centrifugação da placa foi realizada a 1.500xg por 5s segundos, seguida de adição de 80µL de etanol a 70% (mantido a temperatura ambiente) por orifício, selagem e incubação por 15’ em repouso, no escuro e a temperatura ambiente. Na sequência, a placa foi centrifugada a 1.500xg por 45 minutos a 4°C, aberta e seu conteúdo foi removido por inversão brusca da placa sobre a pia. A placa foi pressionada sobre papel absorvente Kimwipes (Kimberly-Clark Global Sales, Inc, Roswell, GA) para secagem das bordas, em seguida, adicionou-se 100 µL de etanol a 70%, a placa foi selada e centrifugada a 1.500xg por 45 minutos a 4°C. Ao final dessa etapa, removeram-se os volumes dos orifícios da placa por inversão, a placa foi mantida invertida sobre vários papéis absorventes Kimwipes, acondicionada no suporte de placas da centrífuga e centrifugada a 1500xg por 10 seg. Ao final, a placa foi acondicionada aberta em termociclador a 60°C por 10’ para secagem, em seguida, a placa foi selada e mantida a -20°C.

Para dar continuidade, a placa foi retirada do freezer, estabilizada à temperatura ambiente e 10µL de formamida HiDi (Applied Biosystems) foram adicionados em cada um dos poços. A placa foi centrifugada a 1.500xg por 5 seg, aquecida a 95°C por 5 minutos no termociclador Veriti (Applied Biosystems) e colocada em banho de gelo por 3 minutos antes de ser submetida ao sequenciador automático ABI Prism 3130xl DNA Sequence (Applied Biosystems).

Após o término, do sequenciamento, as sequências obtidas foram editadas, alinhadas e analisadas pelos programas EDITSEQ, ALIGN e SEQMAN (DNASTAR) e comparadas com as sequências H37RV depositada no Genbank.

Quadro 7: Condições da Reação da PCR sequenciamento de DNA para os genes alvos *rpoB*, *KatG* e *Mab-inhA*.

	Condições dos Ciclos da PCR		
Reação da PCR	KatG435pb	mabA-inhA 885pb	rpoB 250pbs
Sequenciamento de DNA	96 °C - 3min 95 °C - 50s 68 °C - 40s 72° C - 1min 72 °C - 10min 4 °C	94 °C - 3min 94 °C - 30s 65 °C - 40 s 72 °C - 20 s 72 °C- 7 min 4°C	96 °C - 3min 95 °C - 50s 65 °C - 40 s 72 °C - 20 s 72 °C -3min 4 °C

Legenda: °C=grau celsius, X=vezes, pb=pares de base, min=minutos, s=segundos
 Fonte:SANGER,1997.

4.9 Teste Molecular dos Múltiplos Alelos Específicos (MAS-PCR)

Para a análise-MAS-PCR, o ensaio foi realizado em 2 etapas, na primeira etapa foram avaliados os alelos específicos para *rpoB*531 e para região promotora *inhA*-15 e a segunda etapa para o *rpoB*526, *rpoB*516 e *katG*315, mantendo os mesmos parâmetros das condições da reação da PCR descritas por Mokrousov *et al.*, (2002), Yang *et al.*, (2005) e Imperial e *et al.*,(2010), com pequenas alterações no ciclo de anelamento. O tamanho do fragmento, a concentração e as sequência de cada iniciador (primer) utilizados na reação MAS-PCR estão descritas no Quadro 8.

A primeira etapa da reação MAS-PCR foi realizada nas seguintes condições: MgCl₂ (50mM), dNTPs (25mM), tampão 10X, 1U da Taq polimerase, 1µl (20ng) do DNA para um volume final de 50µl completando o volume com H₂O estéril. Os iniciadores utilizados nessa etapa foram: RpoB531 (25pmol/ul), RiRM (30pmol/ul), InhAF (3pmol/ul), InhAR (3pmol/ul). Para segunda etapa os iniciadores utilizados foram KatG5R (4pmol/ul), katGOF (4pmol/ul), rpoB526 (10pmol/ul), RpoB516 (10pmol/ul) e RIRM (30pmol). Os outros reagentes foram utilizados na mesma condição da reação1 (Quadro 10).

Quadro 8: Primer utilizados no MAS-PCR para detecção de mutações nos genes *rpoB*, *katGe* região promotor *inhA-15*.

Primers	Sequencia 5'-3'	Conc.	Tamanho	Fármaco	Referencias
<i>RpoBR531</i>	5' CACAAGCGCCGACTGTC 3'	25 pmol/μl	170 pb		
R526	5' CTGTCGGGGTTGACCCA 3'	10 pmol/μl	185 pb		
R516	5' CAGCTGAGCCAATTCATGGA 3'	10 pmol/μl	218 pb	Rifampicina (RIF)	Igor Mokrousov <i>et al.</i> , 2002
<i>RIRm</i>	5' TTGACCCGCGGTACAC 3'	30 pmol/μl	250 pb		
<i>KatG5R</i>	5' ATAC GAC CTC GAT GCC GCT 3'	4 pmol/μl	292 pb	Isoniazida (INH)	Igor Mokrousov <i>et al.</i> , 2003
KatGOF	5' GCA GAT GGGCTGATCTACG 3'	4 pmol/μl			
<i>InhAP-15</i>	5' GCG CGG TCA GTT CCA CA 3'	3 pmol/μl	270 pb	Isoniazida (INH)	Zhenhua Yang <i>et al.</i> , 2005.
<i>InhAPF2</i>	5' CAC CCC GAC AAC CTA TCG 3'	3 pmol/μl			

Legenda: T=Timina, A=Adenina, C=Citosina, G=Guanina, pb=pares de base, ul= microlitro, pmol/μL= pico mol/microlitro, INH= izoniazida, RIF =rifampicina. Fonte: Adaptada de Mokrousov, I et al 2003.

As etapas das reações 1 e 2 foram incubadas termociclador (MyClycle™ Thermal Cycler–BioRad, Richmond, CA, USA) com o protocolo *Touchdown* incluindo uma etapa de desnaturação de 96 °C por 3', seguidos por 9 ciclos de 95 °C por 50s e 72 °C por 40s e 72 °C por 1'. A temperatura inicial de anelamento (72 °C), diminui 0,5 °C por ciclo durante os 9 ciclos, seguidos por 30 ciclos, com desnaturação de 95 °C por 50s, anelamento 68 °C por 40s e extensão de 72 °C por 1' e uma extensão final de 72 °C por 7'. Nos quadros 10, 11 e 12 estão os parâmetros e as condições das etapas do MAS-PCR para os múltiplos alelos específicos. Para cada reação de PCR foram adicionados dois controles positivos, a cepa referencia MTB H37Rv (27294ATCC) como padrão selvagem “WT” e MTB (9096ATCC) para padrão “mutado”, além de um controle negativo contendo apenas os reagentes da reação MAS-PCR e água no lugar do DNA. Para eletroforese em gel de agarose a 2 % foram utilizados 10 μL do produto amplificado além de um marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb (DNA ladder O'RangeRuler/Fermenta). A presença de bandas para os códons investigados e visualizados no gel de agarose após corrida de eletroforese, indica a região “WT” do códon, (demonstrando ausência de mutação). A ausência de bandas em qualquer um dos códons indicamutação no alelo investigado (Figura 3). O Esquema 1 A, B e C ilustra o sitio de ligação dos primers utilizados na MAS-PCR aos genes alvo e o quadros 9 e 10 os parâmetros da amplificação da reação MAS-PCR.

Quadro 9: Condições de preparo da primeira etapa do Mix MAS-PCR para detecção de múltiplos Alelos específicos nos códons *rpoB* 531 e *inhA*-15

N. DE AMOSTRAS	ÁGUA qsp 50µL	TAMPÃO 10X	MgCl2 50mM	RiRm 10pmol	rpoB 531 25 pmol	InhA F 3 pmol	InhA R 3 pmol	dNTPs A, C, G, T	Taq Polim.	DNA extraído
1X	35,3	5	3	1	1	1	1	0,4	0,3	2
2	70,6	10	6	2	2	2	2	0,8	0,6	4
3	105,9	15	9	3	3	3	3	1,2	0,9	6
4	141,2	20	12	4	4	4	4	1,6	1,2	8
5	176,5	25	15	5	5	5	5	2	1,5	10
6	211,8	30	18	6	6	6	6	2,4	1,8	12
7	247,1	35	21	7	7	7	7	2,8	2,1	14
8	282,4	40	24	8	8	8	8	3,2	2,4	16
9	317,7	45	27	9	9	9	9	3,6	2,7	18
10	353	50	30	10	10	10	10	4	3	20
11	388,3	55	33	11	11	11	11	4,4	3,3	22
12	423,6	60	36	12	12	12	12	4,8	3,6	24

Legenda: X= vezes, qsp=quantidade suficiente para, mM= mine molar, pmol= pico mol, A=Adenina, C=Citosina, G=Guanina, T= Timina. Fonte=própria.

Quadro 10: Condições de preparo da Segunda etapa para reação do Mix MAS-PCR para detecção de múltiplos Alelos específicos nos códons *rpoB*526, *rpoB*516 e *KatG*315

N. DE AMOSTRA	ÁGUA qsp 50µL	TAMPÃO 10X	MgCl2 50 Mm	RiRm 30pmol	rpoB 526 10pmol	rpoB 516 pmol	katGOF 315 4pmol	katG5 R 4pmol	dNTPs A, C, G, T	Taq Polim.	DNA extraído
1X	36,3	5	3	1	1	1	1	1	0,4	0,3	2
2	72,6	10	6	2	2	2	2	2	0,8	0,6	4
3	108,9	15	9	3	3	3	3	3	1,2	0,9	6
4	145,2	20	12	4	4	4	4	4	1,6	1,2	8
5	181,5	25	15	5	5	5	5	5	2	1,5	10
6	217,8	30	18	6	6	6	6	6	2,4	1,8	12
7	254,1	35	21	7	7	7	7	7	2,8	2,1	14
8	290,4	40	24	8	8	8	8	8	3,2	2,4	16
9	326,7	45	27	9	9	9	9	9	3,6	2,7	18
10	363	50	30	10	10	10	10	10	4	3	20
11	399,3	55	33	11	11	11	11	11	4,4	3,3	22
12	435,6	60	36	12	12	12	12	12	4,8	3,6	24

Legenda: X= vezes, qsp=quantidade suficiente para, mM= mine molar, pmol= pico mol, A=Adenina, C=Citosina, G=Guanina, T= Timina. Fonte=própria.

Quadro 11: Parâmetros de amplificação dos múltiplos alelos específicos (MAS-PCR)

Reação	Temperatura(C)	Tempo (min:sec)	Ciclos
	96	3:00	1
Touchdown	95	0:50	9
	72 *	0:40	
	72	1:00	
MAS-PCR	96	3:00	1
	95	0:50	30
	68	0:40	
	72	1:00	
	72	7:00	

*Variação da temperatura inicial de anelamento 72°C diminui 0,5°C por cada ciclo.

Fonte: Imperiale, B,R. *et al.*, 2010. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex allele-specific polymerase chain reaction

O tamanho dos fragmentos visualizados em gel de agarose após amplificação dos alelos específicos dos genes alvos *rpoB*, *katG* e *inhA-15* estão na figura 3. A localização de cada alelo específico, no sitio de ligação dos genes alvos investigados estão no esquema A, B e C. A visualização do padrão de “WT” e “Mutado” observados em gel de agarose de alguns dos alelos específicos encontrados no estudo estão ilustradas a figura 3.

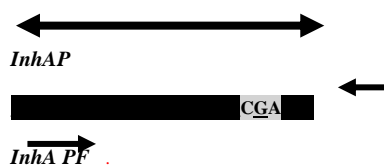
Esquema 1: Localização de ligação dos primers utilizados no MAS-PCR ao sítio alvo do genes *rpoB* (A), *katG* (B) e região promotora *inhA-15* (C) do *M. tuberculosis*.

A) *rpoB* *katG*



c) *inhA-15*

270-pb MAS-PCR fragment: *inhA-15* CGA (WT)

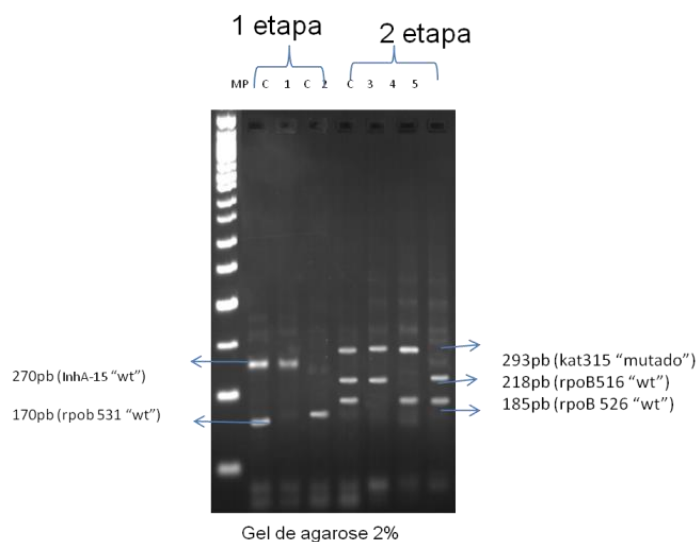


Legenda: As setas indicam o sentido da ligação dos iniciadores. As regiões de anelamento dos iniciadores nos códons estão em negrito. Os iniciadores foram desenhados para se ligar na região selvagem (WT) do códon. O

“não anelamento” dos iniciadores indica possibilidade de “mutação” no códon investigado e não é visualizado no gel de agarose.

Fonte: Mokrousov, I., *et al* 2003.

Figura 3 Eletroforese em gel de agarose 2% dos padrões alelos específicos “WT” e “Mutado” observado



Adaptado de: ZhenhuaYang; Riza Durmaz; Dong Yang; Selami Gunal; Lixin Zhang; Betsy Foxman; Ahmet Sanic; Carl F.Marrs.

4.10 Análise retroativas do padrão de resistência fenotípica

Dados retroativos dos padrão de resistência fenotípica (TSA-MGIT960^R) dos isolados incluídos no estudo foram coletados no Sistema de Gerenciamento do Ambiente Laboratorial–GAL (<https://gal.fiocruz.sus.gov.br/>).

4.11 Análise estatística

A sensibilidade e especificidade da MAS-PCR foi calculada baseada na detecção da resistência à RIF e INH em comparação com o método “padrão ouro” fenotípico e genotípico. Através do software Rstudio (versão3.6/i386-w64-mingw32) disponível: <http://cran.fiocruz.br> foram calculados e interpretados os seguintes parâmetros: Sensibilidade e Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN) e índice Kappa. O intervalo de confiança (IC) adotado foi de 95%. Nível de significância foi de $\alpha= 5\%$ ($p < 0,05$).

A acurácia do método MAS-PCR foi determinada pela concordância entre os métodos: TSA-MGIT960^R e Sequenciamento de DNA na detecção das mutações associadas a resistência fármacos anti-TB (Rifampicina (RIF) e Isoniazida (INH)).

A reprodutibilidade foi avaliada pela repetição do teste em amostra duplicata.

4.12 Calculo do tempo de execução e Custo

O tempo de execução das técnicas por amostra foi calculado com base no grupo e 12 amostras selecionadas aleatoriamente. O tempo médio de execução de cada metodo e o tempo total de execução foi medido de acordo com o tempo gasto em horas para execução de cada etapa dos testes a partir da preparação da amostra para extração de DNA até a liberação do resultado.

O custo dos insumos necessário para cada teste realizado também foi calculado e comparados em moeda local (Reais=R\$).

4.13 Reanalise dos Padrões MAS-PCR

Uma avaliação às cegas com releitura visual dos perfis eletroforéticos do MAS-PCR (gel/foto) de 60% (73/122) dos isolados foi realizada por 2 observadores independentes, com vasta experiência em métodos moleculares. Ambos consideraram os seguintes parâmetros:

- a) Presença de bandas no gel de agarose para padrão “WT”.
- b) Ausência de banda para o padrão “mutado” de acordo com o determinado pela metodologia MAS-PCR para os diferentes alelos específicos para os genes *rpoB*, *katG* e região promotora *inhA-15*.

O resultado da interpretação dos padrões observados pelos 3 observadores seguiu os seguintes parâmetros de concordância:

- a) observador¹ versus observador²;
- b) observador³ versus observador¹
- c) observador³ versus observador².

A direta visualização dos “padrões de bandas” identificados pelos 3 observadores foram anotados em uma tabela *Excel* para calcular o percentual de concordância observado entre os observadores. O grau de concordância adotado foi de:

100%=ótimo,

90-80%=bom,

70-60%=regular,

≤ 50%=ruim/insuficiente.

4.14 Aspectos éticos

O estudo teve a dispensa do CEP-ENSP e CEP-INI e foi cadastrado no serviço de gestão em projetos do INI Protocolo 1382.

5 RESULTADOS

Das 139 culturas estimadas, pelo cálculo amostral e selecionadas para o estudo, 7 estavam contaminadas, 3 não obtivemos uma boa extração de DNA, 5 não conseguimos uma boa purificação ou amplificação para sequenciar alguns dos genes alvos e 2 não possuíam o resultado do TSA armazenado no sistema e por isso foram excluídas do estudo. Sendo assim, 87,7% (122/139) foram selecionados e analisados, pelas metodologias propostas no presente estudo.

De acordo com o padrão de resistência fenotípica, os 122 isolados foram agrupados em sensível (S) referindo-se aos isolados com padrão fenotípico “sensível” para qualquer um dos fármacos testados no estudo (RIF+INH) 5,7% (7/122) e resistente (R) referindo-se a isolados com padrão fenotípico “resistente” a qualquer um dos fármacos testado no estudo (RIF+ INH), 94,2% (115/122), (tabela 1).

Tabela 1: Padrão de resistência fenotípico aos fármacos Rifampicina e isoniazida dos 122 isolados

RIF	INH nº (%)	RIF + INH nº (%)	nº (%)
Sensível (S)	14/122(11,5%)	7/122 (5,7%)	7/115 (5,7%)
Resistente (R)	108/122 (88,5%)	115/122 (94,2%)	108/115 (94%)
Total	122	122	122

Legenda: RIF=rifampicina, INH=isoniazida, S= sensível, R= resistente, n=número, %=percentis.

5.1 Resultados do teste Fenotípico (MGIT^R960).

Dados retrospectivos do teste fenotípico automatizado MGIT90^R, das 122 amostras incluídas no estudo, 94,2% (115/122) tinham padrão de resistência (R) para RIF e/ou INH (R) e 5,7% (7/122) com padrão sensibilidade (S) a esses fármacos testados (TB-S),

Dos 94,2% (115/122) casos resistentes (R) a qualquer um dos fármacos testados, 108/115 (94%) desses apresentaram padrão de multirresistente para ambos os fármacos, rifampicina + isoniazida TB-MDR e 6% (7/115) com padrão de monor resistência somente

para isoniazida (TB-mono-INH). A tabela 2 mostra o padrão da resistência fenotípica dos 115 isolados resistentes avaliados pelo MGIT960^R.

Tabela 2: Padrão fenotípico dos 115 isolados analisados pelo MGIT 960^R

TSA MGIT960 ^R	
TB-Mono resistente INH	7/115 (6%)
TB- MDR	108/115 (94%)
Total ^{Resistente}	115 (100%)

Legenda: R= resistente, INH= Isoniazida, %=porcentagem

5.2 Resultados do Teste Genotípico (Sequenciamento de DNA)

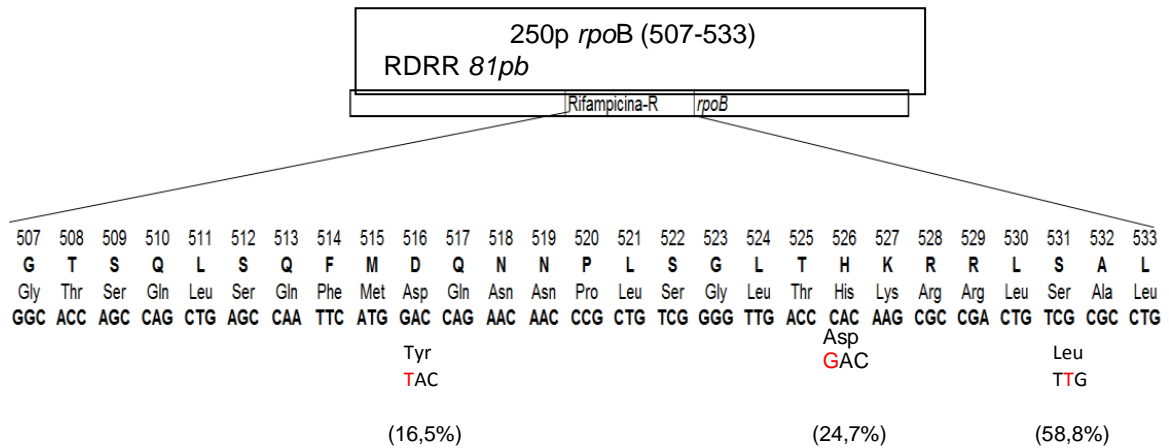
No teste genotípico (Sequenciamento de DNA), dos 122 isolados analisados 97/122 (79,5%) tiveram mutação detectada no gen *rpoB*, distribuídas nos códons 531 com troca de aminoácido de serina para leucina (SerTCG-LeuTTG) em 57 isolados (58,7%), 526 (HisCAC-AspGAC) em 24 (24,7%) e 516 (AspGAC-TyrTAC) em 16 isolados (16,4%). Dos isolados analisados, 25/122 (20,4%) não tiveram mutação detectados no gen *rpoB*, mutações estas que conferem resistência à RIF.

Entre os 122 isolados investigado para gen *katG*, 77% (95/122) a mutação foi detectada no códon 315, com substituição do aminoácido serina para theonina (SerAGC-TheACC) e substituição com troca de amino ácido de serina para asparagina (SerAGC-AspAAC) em 5 isolados. Em 28 isolados a mutação nesse gen não foi detectada. As mutações no gen *katG* conferem resistência à INH.

Na análise do gen *Mab-inhA*, mutações na região promotora *inhA-15* foi detectada em 13/122 (10,6%) com mudança da base C para T, (Citosina/Timina). Desses, 10 isolados apresentaram mutação dupla, ou seja, nos dois alvos *katG315* e *InhA-15*. Além disso, 3/13 isolados com mutação somente em *inhA-15* foi detectado. As mutações na região promotora do gen *inhA* conferem resistência à INH.

A frequência das mutações encontradas nos gens, *rpoB* e *katG*, encontradas pela sequenciamento de DNA, estão ilustradas na figura 4 e 5.

Figura 4: Frequência das mutações detectadas pelo sequenciamento nos códons 531,526 e 516 do gene *rpoB* entre os 122 isolados investigados nesse estudo.

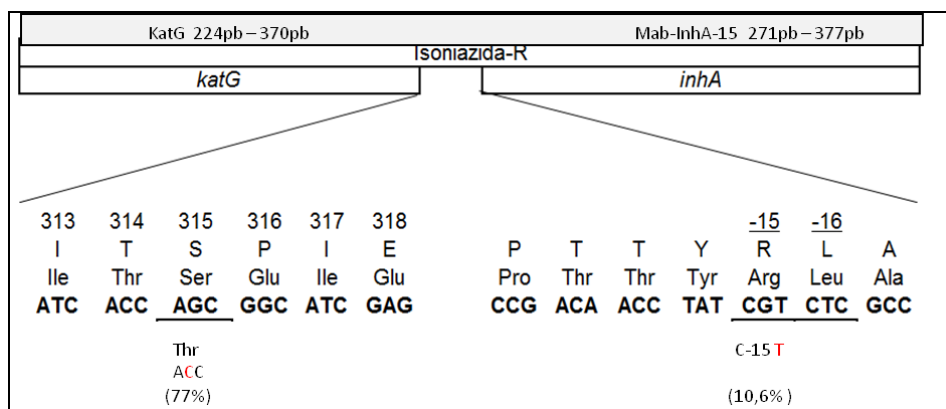


Legenda: A=Adenina, T= Timina, C=Citosina, G=Guanina, RDRR= região determinante da resistência a rifampicina;

Fonte: Retirado de Google imagem adaptada a frequência de mutações no gene *rpoB* encontradas no presente estudo.

Nota-se que a maior frequência das mutações do gene *rpoB*, ocorreu no códon 531 (SerTTGLeu) em 58,8% dos isolados analisados.

Figura 5: Frequência das mutações detectadas no códon 315 do gene *katG* e *Mab-InhA-15* dos 122 isolados analisados nos estudos



Legenda: A=Adenina, T= Timina, C=Citosina, G=Guanina

Fonte: adaptada e Retirado de Google imagem com modificação para a frequência de mutações encontradas nos códons 315 do gen *katG* e *mab-inhA-15* do presente estudo.

Nota-se que mutação no gen *katG* ocorreu em 77% dos isolados investigados. O total das mutações encontradas pelo sequenciamento de DNA para os genes alvo *rpoB*, *katG* e *mab-inhA* estão ilustradas tabela 3.

Tabela 3: Frequência das Mutações encontradas no presente estudo pelo sequenciamento de DNA para os genes alvos *rpoB*, *KatG* e *Mab-inhA-15*.

Gen alvo	Mutação	Isolados %
Gen <i>rpoB</i>	531 (58,7%) 526 (24,7%) 516(16,4%)	97/122 (79%)
Gen <i>katG</i>	315 (77%)	95/122 (77%)
Gen <i>Mab-inhA-15</i>	InhA-15(10,6%)	13/122 (10,6%)
Gen <i>KatG+InhA-5</i>	<i>katG</i> 315+ <i>InhA-15</i>	10/13 (76,9%)
	Mutação Somente <i>inhA-15</i>	3/13 (23%)

Legenda: gen=gene, %=porcentagem.

5.3 Resultados do teste molecular (MAS-PCR)

Todas as 122 amostras foram submetidas ao ensaio, MAS-PCR e foram classificadas de acordo com perfil “Mutado” (ausência de banda para os alvos com mutação no códon investigado associada a resistência ao fármaco RIF e INH) ou “WT” (presença de bandas para os alvos sensível aos fármacos investigados). Os alvos investigados foram: gene *rpoB*, associado a resistência a RIF, *katG* e região promotora *InhA-15*, ambos associados a resistência à INH.

O perfil “mutado” para o gene *rpoB* foi detectado em 74,4% (91/122) e o perfil “WT” foi 25,4% (31/122) dos isolados testados para esse alvo. A frequência dos alelos específicos “mutados” no gene *rpoB* detectados no códon 531 foi 61% (56/91), no códon 526 foi de 21% (19/91) e no códon 516 foi 18% (16/91). Mutação dupla nos códons 531 e 516 também foram detectadas em dois isolados.

Para o gene *katG* o perfil mutado foi em 78,6% (96/122) e 11,4% (14/122) na região promotora *inhA-15*. Mutação dupla no gene *katG* + *inhA-15* foi detectado pelo MAS-PCR em 9 isolados (8,1%), além disso, em 3 isolados (2,7%) mutação somente na região promotora *inhA-15* foi detectado. A frequência das mutações encontradas nos genes *rpoB*, *KatG* e região promotora detectada pelo, MAS-PCR estão ilustradas na Tabela 4.

Tabela 4: Frequência das mutações nos genes *rpoB*, *katG* e região promotora *inhA-15* detectada pelo MAS-PCR

Frequência das mutações detectadas pelo MAS-PCR nos genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> e <i>inhA-15</i>			
<i>Alvos</i>	<i>Gen</i>	<i>Amostra</i>	<i>Frequência</i>
	<i>rpoB 531</i>	56/91	61%
<i>RpoB</i>	<i>rpoB 526</i>	19/91	21%
	<i>rpoB516</i>	16/91	18%
<i>Freq. mutações rpoB</i>		91/122	74,4 %
<i>KatG</i>	<i>katG 315</i>	96/122	78,6%
<i>Mutação rpoB + KatG</i>	<i>KatG + rpoB</i>	90/108	74%
<i>Reg Promotora InhA-15</i>	<i>InhA-15</i>	14/122	11,4%
<i>KatG + InhA-15</i>	<i>InhA-15 + katG 315</i>	9/110	8,1%
<i>Somente InA-15</i>	<i>InhA-15</i>	3/110	2,7%

Legenda: n=número,(%)=percentis,X=versos, SenS=sensibilidade, Esp=especificidade, VPP=valor preditivo positivo, VPN=valor preditivo negativo, kappa=índice kappa. Freq=frequência, Reg= região promotora.

5.4 Comparação do MAS-PCR com o teste Fenotípico (TSA-MGIT960^R)

Dentre os 108/122 isolados com resistência fenotípica para à RIF, o MAS-PCR detectou mutação no gene *rpo* EMB 81,5% (88/108), ou seja, em 18,5% (20/108) das amostras com resistência a esse fármaco o MAS-PCR não detectou mutação. Entre os 115/122 isolados com resistência fenotípica à INH, o, MAS-PCR detectou mutação em 82% (95/115) e 17,3% (20/115) a mutação para esse fármaco não foi detectados. A sensibilidade do MAS-PCR foi de 72% para o fenotípico de resistência à RIF e de 83% para o fenotípico de resistência à INH. A concordância do MAS-PCR comparado com o TSA-MGIT960^R na detecção das mutações associada a resistênciafeno típica foi de 81,1% (99/122) entre os padrões sensível e resistente aos fármacos (tabela 5 e 6).

Tabela 5: Comparação do MAS-PCR com o teste TSA-MGIT960^R na detecção fenotípico da resistência aos fármacos RIF e INH.

TSA-MGIT 960 ^R		MAS-PCR		SenS	Esp	VPP	VPN	Kappa
Fármaco	Res	Sem						
Rifampicina	108	14	88/108 (81,5%)	72%	100%	86,8%	34,4%	0.80
Isoniazida	115	7	95/115 (82%)	83%	100%	100%	26%	0.82

Legenda: n=número, (%)=percentis, X=versos, SenS=sensibilidade, Esp=especificidade, VPP=valor preditivo positivo, VPN=valor preditivo negativo.

Tabela 6: Análise MAS-PCR comparado ao teste fenotípico TSA-MGIT960.

	Teste Fenotípico TSA-MGIT960			SenS	Esp	VPP	VPN	Kappa
	Res	Sem	Total					
MAS-PCR Detectado	99	0	99	86,%	100%	100%	86%	0,81
Não detectado	16	7	23					
Total	115	7	122					
Concordância	MAS-PCR vs Padrão ouro Fenotípico 81,1%							

Res=resistente, Sen=Sensível, SenS=sensibilidade, Esp=especificidade, VPP=valor preditivo positivo, VPN= valor preditivo Negativo.

5.5 Comparação do MAS-PCR com o teste Genotípico (sequenciamento de DNA)

Na comparação da MAS-PCR com o teste genotípico padrão “ouro” (sequenciamento DNA) na detecção das mutações pontuais no gene *rpoB*, MAS-PCR foi capaz de detectar 93,8% (91/97) dessas mutações, com uma sensibilidade e especificidade de 100 % /100%/96%/92%; 94%/98% para os códons 531, 526 e 516 respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação da MAS-PCR com o Sequenciamento de DNA na detecção das mutações pontuais nos códons 531, 526 e 516 do gene *rpoB*.

MAS-PCR vs Sequenciamento de DNA (gene <i>rpoB</i> 531)								
Alvos		Mutado	WT	Total	SenS	Esp	VPP	VPN
<i>rpoB</i> 531	Detectado	56	0	56	100	100	100	95
	Não detectado	0	66	66				
	Total56	66	122					

MAS-PCR vs Sequenciamento de DNA (gene <i>rpoB</i> 526)								
Alvos		Mutado	WT	Total	SenS	ESp	VPP	VPN
<i>rpoB</i> 526	Detectado	15	4	19	79	72	79	72
	Não detectado	4	99	103				
	Total	19	103	122				

MAS-PCR vs Sequenciamento de DNA (gene <i>rpoB</i> 516)								
Alvos		Mutado	WT	Total	SenS	ESp	VPP	VPN
<i>rpoB</i> 516	Detectado	15	2	17	94	98	88	99
	Não detectado	1	104	105				
	Total	16	106	122				

Legenda: Sem= Sensibilidade, Esp=especificidade, VPP=valor preditivo Positivo, VPN= valor preditivo negativo.
Fonte: Própria

A concordância da MAS-PCR na detecção das mutações nos códons 531, 526 e 516 do gene *rpoB* foi de 83% (91/109) índice kappa de 0,83.

Dos 95 isolados com mutação no gene *KatG315*, identificadas pelo sequenciamento de DNA, o MAS-PCR detectou 97,8% (93/95) dessas mutações, com uma sensibilidade de 96% especificidade de 92%. Dos 14 isolados mutados no gene *mab-inhA-15* identificados pelo sequenciamento de DNA, o MAS-PCR detectou 13 mutações na região promotora

desse gene. Além disso, dez desses isolados apresentaram mutação simultânea em *katG* e *inhA-15* e 3 tinham mutação somente pra *inhA-15* detectadas pelo MAS-PCR em concordância com o sequenciamento (tabela 8).

Tabela 8: Comparação da MAS-PCR e Sequenciamento de DNA na determinação das mutações no gene *katG315* e na região promotora *inhA-15*.

		Sequenciamento de DNA gene <i>katG</i>							
MAS-PCR		Mutado	W T	Total	SenS	Esp	VPP	VPN	kappa
<i>katG315</i>	Detectado	93	2	95	96%	92%	98%	85%	0.95
	Não detectado	4	23	27					
	Total	97	25	122					

		Sequenciamento de DNA região promotora <i>inhA-15</i>							
MAS-PCR		Mutado	WT	Total	SenS	ESp	VPP	VPN	kappa
<i>inhA-15</i>	Detectado	13	1	14	92%	98%	86%	99%	0,92
	Não detectado	1	107	108					
	Total	14	108	122					

Legenda: Sem=Sensibilidade, Esp=especificidade, VPP=valor preditivo positivo, VPN= valor preditivo negativo.

A taxa de concordância do MAS-PCR com o sequenciamento de DNA na detecção de mutações associada ao gene *katG315* foi de 95% (93/97) e para mutações na região promotora *inhA-15* a concordância foi de 92% (12/13).

O sequenciamento de DNA detectou mutações associadas a multirresistência (*rpoB* e *katG*) do MTB em de 97% dos isolados testados, já o MAS-PCR detectou 91,8% dessas mutações. Sobre tudo, ao levarem consideração o método TSA-MGIT960® como padrão “ouro” na detecção da multirresistência do MTB, O percentual de detecção dos isolados multirresistentes (resistente a RIF + INH) pelo MAS-PCR foi de 74% (90/108). A tabela 9 resume o resultado das diferentes técnicas na detecção da resistência nos isolados investigados no presente estudo.

Tabela 9: Resumo do percentual de detecção do padrão de resistência encontrado entre as metodologias avaliadas nesse estudo (dos 122 isolados).

	TSA-MGIT960®	Sequenciamento de DNA		MAS-PCR	
Resistência a RIF		Mutação <i>rpoB</i>		Mutação <i>rpoB</i>	
	108/122 (88,5%)	97/122 (79%)		91/122 (74,4%)	
Resistência a INH		Mutação <i>katG</i>	<i>inhA-15</i>	Mutação <i>katG</i>	<i>inhA-15</i>
	115/122(94,2%)	94/122 (77%)	13/122 (10,8%)	96/122 (78,6%)	14/122(11%)
Resistência a RIF+ INH		Mutação <i>rpoB</i> + <i>katG</i>		Mutação <i>rpoB</i> + <i>katG</i>	
Total	108/122 (88,5%)	93/122 (76,2%)		90/122 (73,7%)	
Resistencia detectado	115/122 (94,2%)	106/122 (86%)		99/122 (81%)	

Legenda: Rif=rifampicina, INH=isoniazida.

5.6 MAS-PCR no diagnóstico da TB resistente.

Dos 7 isolados fenotipicamente e genotipicamente sensível, 100% (7/7) foram identificados corretamente pelo ensaio, MAS-PCR. Entre os 115 casos TB-DR, 95,6% (110/115) tiveram a resistência detectada e 4,3% (5/115) não detectada pelo MAS-PCR. Nos casos de TB-MDR, 83,5%, (90/108) tiveram a resistência múltipla (RIF + INH) detectada e em 16,6% (18/108) a resistêncianão foi detectada pelo MAS-PCR. (tabela 11). Entre os 7 casos de TB-mono resistente a INH, 85,7% (6) a mutação associada resistênci a esse fármaco foi confirmada e 14,2% (1/7) não foi detectada (Tabela 10).

Tabela 10: MAS-PCR na detecção dos casos de tuberculose monoresistente a isoniazida (TB-mono-INH).

Tuberculose Mono resistência-INH	n	%
INH ^R Detectado	6/7	85,7%
Mutação detectada <i>katG</i>	5/6	71,4%
Mutação somente <i>inhA-15</i>	1/6	14,2%
Não detectado	1/7	14,2%

Legenda: INH^R=isoniazida resistente

Tabela 11: MAS-PCR na detecção dos casos de TB-MDR

Tuberculose multirresistente		n ^o	%
TSA	TB-MDR	90/108	83,3%
	TB-MDR não detectada	18/108	16,6%
Total		108	

Legenda: TSA= teste de sensibilidade antibiograma, TB-MDR= Tuberculose multiresistente.

5.7 Avaliação do Método, MAS-PCR

O método, MAS-PCR também foi avaliado no presente estudo da seguinte forma. Comparamos o “tempo” de execução, tempo de liberação do “resultado” e o “custo” de 12 amostras submetidas a técnica MGIT960, sequenciamento e MAS-PCR na detecção da resistência aos fármacos anti-TB (RIF e INH) levando em consideração as seguintes questões:

- 1) O tempo gasto a partir do preparo da amostra após seleção da cultura até o término da execução das técnicas, expressos em minutos/hora/dias. (Quadro 12a, b, c).
- 2) O tempo médio da análise do resultado e liberação do diagnóstico MAS-PCR em comparação ao TSA e Sequenciamento (Quadros 12a, b, c).
- 3) O custo médio dos reagentes e insumos utilizados nas metodologias propostas
- 4) A eficácia do método na detecção das mutações associadas a resistência a RIF e INH (Quadro 13).

Quadro 12a: Tempo de execução da técnica TSA-MGIT^R960 relacionada a 12 amostras.

Etapa do TSA-MGIT960	Tempo de execução do TSA –MGIT 960 por amostra / minutos/horas/dias											
	Amostras											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Seleção da culturas	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Preparação da bateria	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
Preparação do inoculo	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
Diluição e EscalaMc.Farland	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Distribuição do teste	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Incubação no MGIT960	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Tempo de processamento do Teste no equipamento	20.160	20.160	20.160	20.160	20.160	20.160	20.160	20.160	20.160	20.160	20.160	20.160
Leitura e interpretação da resistencia ao farmaco	3	3	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
Total em minutos	20177	20191	20211	20228	20245	20262	20279	20296	20313	20330	20347	20364
Total em horas	336,283	336,5166667	336,85	337,13333	337,4167	337,7	337,983333	338,26667	338,55	338,8333	339,117	339,4
Total em dias	14,0118	14,02152778	14,03542	14,047222	14,05903	14,070833	14,0826389	14,094444	14,10625	14,11806	14,1299	14,1417

Quadro 12b: Tempo de execução da técnica de sequenciamento de DNA relacionado à 12 amostras.

Etapas do Sequenciamento DNA	Tempo de execução Sequenciamento de DNA por amostra/minutos/horas/ dias											
	Amostras											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Preparação da amostra DNA	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Pré PCR seq gen rpoB	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120
Pré PCR seq gen KatG	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120
Pré PCR seq gen Mab-inhA	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120
Preparação gel de agarose	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Aplicação da amostra em gel de agarose	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Eletroforese	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Purificação do PCR seq.	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Preparação da Placa de PCR seq.	7	14	21	28	35	42	48	55	62	69	76	83
Reação Sequenciamento	1.080	1.080	1.080	1.080	1.080	1.080	1.080	1.080	1.080	1.080	1.080	1.080
Edição das Sequencias	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Alinhamento e análise das Sequencias.	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
leitura e Analise das Mutações	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400	440	480
Liberação do resultado	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Total em minutos	1600	1720	1840	1960	2080	2200	2319	2439	2559	2679	2799	2919
Total em horas	53,3333	57,33333333	61,33333	65,333333	69,33333	73,333333	77,3	81,3	85,3	89,3	93,3	97,3
Total em dias	2,22222	2,388888889	2,555556	2,722222	2,888889	3,0555556	3,2208333	3,3875	3,554167	3,720833	3,8875	4,05417

Quadro 12C: Tempo de execução da técnica MAS-PCR relacionado a 12 amostras

Etapas do teste Molecular MAS-PCR	Tempo de execução MAS-PCR por amostra /minutos/horas/dias											
	Amostras											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Preparação da amostra DNA	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
Preparação da 1 ^o etapa MAS-PCR rpob 531/ inhA-5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Preparação da 2 ^o etapa MAS-PCR rpob 526/ 516/ kat315	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Reação dos Múltiplos alelos específicos MAS-PCR	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210
Preparação do gel de agarose	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Aplicação da amostra no gel de agarose	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Eletroforese	60	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Foto Registro e arquivamento do gel de eletroforese	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Análise das mutações rpob 531/ inhA-15	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Análise das mutações rpob 526/516/katG315	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Análise da qualidade dos padrões do MAS-PCR	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
Liberção do resultado	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
Total em minutos	386	362	408	454	500	546	592	638	684	730	776	822
Total em horas	6,433333	6,033333333	6,8	7,5666667	8,333333	9,1	9,86666667	10,633333	11,4	12,16667	12,93333333	13,7
Total em dias	0,268056	0,251388889	0,283333	0,3152778	0,347222	0,3791667	0,411111111	0,4430556	0,475	0,506944	0,538888889	0,570833

A análise mostrou que o tempo médio de execução foi de aproximadamente 14 dias, para os métodos TSA-MGIT^R, menos que 4 dias, (3,3 dias) para o sequenciamento de DNA e um pouco mais de 1 dia (1,7 dias) para MAS-PCR (Quadro 12a,12b,12c).

O quadro 13, mostra custo de uma amostra, em cada técnica avaliada no presente estudo com seu respectivo valor convertido em moeda nacional (R\$) e também o grau de complexidade das técnicas na detecção do MTB resistente aos fármacos RIF e INH.

Quadro 13: Comparação do custo, tempo médio de execução, interpretação e liberaçã do resultado dos testes MGIT960, Sequenciamento e MAS-PCR para uma amostra.

1 amostra	MGIT 960®	Sequenciamento	MAS-PCR
Custo estimado para 1 teste em R\$	176,00	33,75	25,00
Tempo estimado do teste em dias	7-14	4-6	1-2
Execução do teste	Moderado	Complexo	Fácil
Interpretação do resultado do teste	Moderado	Complexo	Moderado
Liberção do diagnóstico da resistência RIF e INH em dias	15	10	3

Uma reavaliação visual dos padrões, MAS-PCR obtidos e registrados em foto documentação do gel de agarose, foi realizado com 3 observadores da seguinte maneira: 8 fotos de géis, aleatoriamente selecionados, totalizando 73 (60%) dos isolados avaliados no estudo, foram reavaliados visualmente em momentos distintos pelos observadores (Tabela 12). Considerando os seguintes critérios para os padrões MAS-PCR observados em foto de gel de agarose:

- Presença de banda para “WT”,
- Ausência de banda para “mutado” e
- Não detectado “ND”, caso o observador não consiga interpretar o padrão observado.

Tabela 12: Resultado da reavaliado visual dos 3 observadores, dos padrões, MAS-PCR “Mutados” e “WT” após foto de gel de agarose.

<i>rpoB</i>	Códons									<i>katG</i>	<i>inhA-15</i>				
	531			526			516			315			<i>inhA-15</i>		
	Mut	Wt	N D	Mut	W t	ND	Mut	W t	ND	Mut	W t	ND	Mut	W t	ND
Observador 1	31	42	0	11	62	0	17	56	0	52	21	0	7	66	0
Observador 2	30	40	3	8	62	3	14	56	3	52	18	3	4	66	3
Observador 3	32	40	1	11	62	0	16	57	0	52	20	1	6	66	1

Legenda: Mut=mutação, WT= wath type, ND=Não detectado.

A avaliação da concordância entre os três observadores foi medida em porcentagem com base nas recomendações de Landis e Koch com pequenas modificações conforme os valores a seguir: Ótimo, Bom e regular (Tabela 13).

Os resultados dessa análise evidenciou uma média de concordância de $Kappa=0,64$ na identificação dos padrões “Mutado” e de $Kappa=0,96$ para os padrões “WT”. De acordo com a análise visual entre os 3 observadores.

A concordância da leitura de interpretação dos observadores, foi em média $Kappa=0,75$ para os padrões “Mutado” e de $kappa=0,95$ para “WT”. Conforme observado na tabela 13.

Tabela 13: Comparação da leitura visual entre os 3 observadores dos 73 padrões MAS-PCR.

	Observador 1 e 2		Observador 1 e 3		Observador 2 e 3	
	Mut	WT	Mut	WT	Mut	WT
rpoB 531	31/30(96%)	42/40(95%)	31/32 (96%)	42/40 (100%)	30/32(93%)	40/42(95%)
rpoB 526	11/8(72%)	62/62(100%)	11/11(100%)	62/62 (100%)	8/11(72%)	62/62(100%)
rpoB 516	17/14(82%)	56/56(100%)	17/16(94%)	56/57(98%)	14/16(87%)	56/57(98%)
katG 315	52/52(100%)	21/18(85%)	52/52(100%)	21/20 (95%)	52/52(100)	18/20(90%)
inhA-15	7/4(57%)	66/66 (100%)	7/6(85%)	66/66 (100%)	4/6(66%)	66/66(100%)
Concordância	Boa	Muito boa	Muito Boa	muito boa	Boa	Muito boa

Legenda: Mut=mutação, WT= wath type (sem mutação).

“A concordância entre os observadores foi considerada boa, para os padrões ‘Mutados’ e de muito boapara os padrões ‘WT’. Baseado na categorização apresentada na tabela 14 com o grau categórico adotado nesse estudo.

Tabela 14: Grau categórico adotado para a concordância dos padrões “WT” e “Mutados” observados pelos 3 observadores no presente estudo.

Concordância	Grau categórico
Ótima	100-99 %
Muito boa	90-79
Boa	70-59 %
Ruim/insuficiente	≤50

Legenda: % percenti, ≤ igual ou menor que.

Fonte: Escala de concordância índice Kappa com modificações (adaptado de Landis & Koch, Biometrics 1977).

6 DISCUSSÃO

Métodos que sejam capazes de detectar a TB-DR e TB-MDR, são de grande relevância para o sistema de saúde do Brasil, mas ainda são um grande desafio para o PNCT.

A escolha da, MAS-PCR como ferramenta de diagnóstico da tuberculose resistente no nosso estudo foi baseada nos diferentes estudos que demonstra uma elevada sensibilidade e especificidade do método na detecção da TB-MDR. No estudo de Z. Yang e colaboradores (2005) por exemplo, a sensibilidade e especificidade do, MAS-PCR foi 93% e 98,9% respectivamente na detecção simultânea dos genes *rpoB* e *katG*.

No estudo de THO e colaboradores (2008) eles compararam a técnica MAS-PCR com o método comercial GenoType MTBDRplus (Fita Hai), a sensibilidade do teste MAS-PCR e MTBDRplus foram respectivamente 83,7% e 93,3% e ambos tiveram especificidade de 100%. Os autores concluíram que o teste MAS-PCR é um método molecular rápido e pode auxiliar no diagnóstico da tuberculose (THO, *et al.*, 2008).

No presente estudo, ao compararmos, MAS-PCR e TSA-MGIT960, nossos dados demonstraram uma sensibilidade e especificidade de 86% e 100% respectivamente, com uma concordância de 81,1% na detecção os casos de TB-DR. O MAS-PCR identificou corretamente 93,5% dos casos de TB-MDR o que consideramos de maior relevância do estudo. Além disso, na detecção dos casos de TB-mono-resistência-INH o ensaio MAS-PCR foi capaz de detectar 100% dos casos investigados. Levando em consideração que a resistência somente para INH geralmente é acompanhada pelo desenvolvimento da resistência à RIF, para nós esse fato reforça a ideia que o diagnóstico rápido dos casos com mono resistência INH pode ajudar a prevenir o surgimento de casos de TB-MDR na população. (BERGVAL *et al.*, 2012).

Na comparação das mutações no gene *KatG* e região promotora *InhA-15* determinada pelo método genotípico (sequenciamento de DNA), no nosso estudo, a MAS-PCR foi capaz de detectar 76,9% das mutações, em um ambos os alvos, com uma concordância de $k=0,82$. A sensibilidade e especificidade da, MAS-PCR comparados ao sequenciamento foi de 85% e 91%, respectivamente.

Resultado semelhante foi observado no estudo de Herrera-León e colaboradores (2005), que também comparam a, MAS-PCR com o sequenciamento de DNA na determinação da frequência de mutações no códon 315 do gene *katG315* e na região

promotora *inhA*. No trabalho de Herrera-León e colaboradores (2005), 68,7% dos isolados investigados tinham uma ou ambas mutações nesses genes alvo. A sensibilidade do método MAS-PCR na detecção da frequência dessas mutações foi de 85% e especificidade foi de 100%. Os autores concluíram que o MAS-PCR é um método de fácil execução e interpretação e pode ser implementado na rotina laboratorial em países com alta frequência e prevalência da tuberculose resistente a INH.

O presente estudo objetivou a detecção rápida da TB-DR e TB-MDR em culturas estocadas no banco de cepas do laboratório do CRPHF. Entretanto, vale ressaltar que SIU e colaboradores (2011) sugerem a técnica em amostras direta de escarro e afirma ser bastante específica na detecção do MTB resistente.

Nossos resultados demonstram que a MAS-PCR foi bastante eficiente na determinação das principais mutações associadas à resistência aos fármacos RIF e INH, mas não foi capaz de detectar o padrão de resistência em 13,9% dos casos investigados (falso negativo). A ausência de mutação nesses isolados pode ser atribuído a um possível envolvimento de mutação em outro códon ou até mesmo por outros mecanismos de resistência que aqui não foram investigados (TAGHAVI, *et al.*, 2011).

Colônias das MTB, apesar de originarem de uma única célula elas não têm comportamento homogêneo frente aos fármacos anti-TB. Para Gillespie (2002) em toda a população de bacilos sensível existe uma pequena proporção de bacilos naturalmente resistente (Heterorresistencia), que pode sofrer mutações espontâneas e apresentar resistência fenotípica a algum fármaco. Além disso, essa resistência pode não estar diretamente relacionada a mutação gênica (que são a maioria dos métodos genotípicos/moleculares), mas pode ocasionar falhas na terapia anti-TB.

Vale apenas ressaltar, que apesar do teste fenotípico, detectar resistência, independente do mecanismo de resistência (natural ou gênica, conhecido ou não), adotado pelo MTB, o MAS-PCR, permite a utilização simultânea de outros genes alvos envolvidos na resistência do MTB proporcionando a detecção dos casos mais graves de resistência, através da detecção de mutações sem genes associadas a resistência aos fármacos de segunda linha (VADWAI, V. *et al.*, 2012).

Embora, o, MAS-PCR tenha a limitação de detectar apenas mutações conhecidas e apresentar uma baixa sensibilidade na detecção de mutações do MTB em amostra direta de escarro. Estudos vêm discutindo e apontando soluções para essas limitações. Igor Mokrousov e colaboradores (2003), por exemplo, sugeriram o uso de mais 1 par de primers

internos na reação, MAS-PCR para detecção de múltiplos alelos específicos no gene *rpoB*. Essa nova variação da reação MAS-PCR permite amplificar mais uma sequência, próxima ao sítio alvo “multado” do gene *rpoB*, que na ausência ou presença da mutação, um produto é amplificado e pode servir como controle da reação MAS-PCR. (IGOR MOKROUSOV, 2003).

Recentemente, no estudo de MISTRI e colaboradores (2016), os autores sugerem o uso de primers com “base degenerada”, para melhorar a performance do MAS-PCR na detecção dos múltiplos alelos mutantes. Nesse ensaio, diferente do MAS-PCR tradicional, o produto amplificado e visualiza em gel de eletroforese é o alelo “mutado” e não alelo “WT”. Esses autores propõem uma pré amplificação (Nested-PCR) do gene alvo, que possibilita o aumento da quantidade de amplicon, para a reação MAS-PCR, aumentando significativamente a quantidade de mutantes presentes na amostra e diminuindo a chance de erro de interpretação ou dúvida do padrão multado em consequência da baixa concentração de mutantes na amostra investigada. Para esses, pesquisadores, essa nova adaptação do MAS-PCR pode contribuir para o aumento da sensibilidade do método MAS-PCR na detecção de mutantes resistentes em amostras diretas de escarro. (MISTRI, S.K *et al.*, 2016).

Embora nossos resultados demonstrarem um elevado valor de significância estatística obtidos pelo ensaio MAS-PCR na detecção da TB-DR, nós avaliamos a performance do MAS-PCR no diagnóstico rápido comparando o tempo de execução e o tempo de liberação do resultado das técnicas MGIT960, Sequenciamento e o MAS-PCR. Além disso uma reavaliação com 3 observadores dos padrões MAS-PCR de 60% (73/122) dos isolados investigados foi realizada, a fim de determinar a acurácia do método MAS-PCR.

O tempo de diagnóstico dos casos TB-DR investigados pelo MAS-PCR foi “menor” (2 dias), comparado com TSA-MGIT960 (14 dias) e Sequenciamento (5 dias).

A avaliação de reprodutibilidade de testes e exames de diagnóstico baseados em análise de observadores tem sido realizada em diferentes estudos e serviram como base na condução dos nossos achados (SOUZA *et al.*, 2006, MEDEIROS, 2009).

Na reanálise dos padrões MAS-PCR em foto de gel de agarose após eletroforese, os 3 observadores tiveram uma boa concordância na reavaliação dos padrões “WT” ($k=0,99$), sobre tudo, para o padrão “mutado” o grau de concordância entre os observadores variou de 60% a 75%. Nesse caso entendemos que o ensaio MAS-PCR tem baixo nível de dificuldade para interpretar os padrões MAS-PCR sem mutação (padrão “WT”), e moderado para

multado. Embora o grau de concordância dos observadores entre os padrões “mutados” estejam na categoria de “**Boa concordância**”.

Muitas técnicas e novas tecnologias estão sendo padronizadas para serem utilizadas em grande escala, para identificação e detecção do MTB resistente aos fármacos, como o teste rápido molecular-TRM-TB/RIF e Fita Haim. O (GeneXpert/MTB/RIF) por exemplo, permitir identificar e detectar bacilos resistentes à RIF diretamente a partir de material clínico em um curto período de tempo (2 horas). Essa técnica, no entanto, não avaliam a resistência a INH. Demonstrando em nosso estudo um potencial de utilização do MAS-PCR que poderia então ser complementar ao método molecular GeneXpert especialmente na avaliação de resistência a INH, já que o método comercial Fita Hain tem auto custo e disponibilidade limitada (DUROVNI *et al.*, 2014; ROSSAU *et al.*, 1997).

Uma limitação do presente estudo é o fato do MAS-PCR ter sido avaliado apenas em culturas. O GeneXpert por exemplo permite análise direta em amostra clínica. Siu e colaboradores utilizaram a técnica MAS-PCR diretamente em amostras de escarro e obtiveram bons resultados, sobre tudo o diferencial da técnica do MAS-PCR é que o GenXpert detecta apenas resistência a rifampicina o que torna o diagnóstico da TB-MDR mais demora pois depende do crescimento do bacilo em meio com droga, já o MAS-PCR permite detecção simultaneamente do MTB resistente a RIF e INH, em uma única reação da PCR o que torna mais rápido o diagnóstico da TB-MDR.

Nossos resultados sugere que o método MAS-PCR é mais rápido, tem custo baixo e pode ser utilizado na rotina de laboratório clínico como ferramenta de diagnóstico da TB-DR e TB-MDR. Sobre tudo novos estudos com um número maior de isolados devem ser avaliados para melhor consolidar nossos resultados.

7 CONCLUSÃO

- Nossos resultados apontam, que, o, MAS-PCR pode ser uma ferramenta útil e bastante promissora para auxiliar o diagnóstico da TB-MDR e também para reduzir a dependência das indústrias de Kits de diagnóstico.
- Na análise da eficácia do método MAS-PCR na definição dos padrões de resistência associados ao diagnóstico da TB-DR e TB-MDR a metodologia teve uma boa acurácia, comparada método fenotípico (TSA-MGIT960) e genotípico (sequenciamento de DNA).
- Nossos dados apontaram um frequência alta de mutações no gene KatG e uma frequência baixa de mutações na região promotora InhA-15 nos isolados do CRPHF. Além disso, apesar de ter uma frequência baixa, isolados com mutação somente na região promotora inhA-15 também foi encontrada no presente estudo. O que nos possibilitou obter informações adicionais essenciais do panorama da tuberculose mono resistentes a isoniazida (TB-mono INH) do Centro de Referência Nacional em bacteriologia da Tuberculose (CRPHF).
- Na avaliação do método MAS_PCR na detecção simultânea das mutações que conferem resistência a rifampicina e isoniazida, acreditamos que a técnica possa ser adaptada e aplicada em laboratório de rotina como método de triagem no diagnóstico da TB-DR e TB-MDR.

Apesar dos bons níveis de confiabilidade encontradas no presente estudo a técnica, MAS-PCR necessita ser aperfeiçoada e avaliada com um número maior de isolados, para melhor consolidar nossos resultados.

REFERÊNCIAS

- ABATEG.; HOFFNER, S.; THOMSEN,E.; OSTERGAARD, V.; MIOINER, H.
Characterization of isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in *katG*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, n. 20, p. 329–333, 2001.DOI: <https://doi.org/10.1007/PL00011272>. Acesso em: 06 mar. 2017.
- ALLEGUI, Z.; ASMA GHARIANI, A.; DRAOUI, H.; GHEZAL, A.; MEHIRI, M.; SLIM-SAIDI, L. Detection of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay.**International Journal of Mycobacteriology**, v. 1, n. 1, p. 34-39, 2012.DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2012.01.006>. Acesso em: 20 fev. 2017.
- ANTUNES, J. L. F.; WALDMAN, E. A.; MORAES, M. A tuberculose através do século: ícones canônicos e signos do combate à enfermidade. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 367-79, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232000000200010>. Acesso em: 20 fev. 2017.
- ASSIS, N. C. S.; LOPES, M. L.; CARDOSON, C.; COSTAM, M.; SOUSA, C. O.; LIMAK, V. B. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 1-7,2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000100003>. Acesso em: 20 fev. 2017.
- BANADA, P. P.; SIVASUBRAMANI, S. K.; BLAKEMORE, R. *et al.* Containment of bioaerosol infection risk by theXpert MTB/ RIF assay and its applicability to point-of-care settings. **American Society for Microbiology Journals**, n. 18, 2010. DOI: 10.1128/JCM.01053-10. Acesso em: 20 fev. 2017.

BERGVAL, I.; KWOK, B.; SCHUITEMA, A. *et al.* Pre-Existing Isoniazid Resistance, but Not the Genotype of *Mycobacterium Tuberculosis* Drives Rifampicin Resistance Codon Preference *in Vitro*. **PLoS One**, v. 7, n. 1, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0029108. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22235262>. Acesso em: 15 jun. 2017.

BLANCHARD, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 215-239, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001243>. Acesso em: 22 out. 2017.

BOEHME, C. C.; NABETA, P.; HILLEMANN, D. *et al.* Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 11, Sep. 9, 2010. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa0907847?articleTools=true>. Acesso em: 12 out. 2017.

BRAGA, J. U.; BARRETO, A. M.; HIJJAR, M. A. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995-97, IERDTB. Parte III: Principais resultados. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 11, n. 1, p. 76-81, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da Tuberculose**. Rio de Janeiro, 1994. 115p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Rede Brasileira de Avaliação Tecnologia e Saúde. Xpert® MTB/RIF no diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**, ano 6, n. 16, p. 1-14, 2011. Disponível em: <http://rebrats.saude.gov.br/institucional/brats?download=92:n-16-xpert-mtb-rif-no-diagnostico-da-tuberculose-pulmonar>. Acesso em: 12 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Portaria nº 48**, de 10 de setembro de 2013. Torna pública a decisão de incorporar o Teste Xpert MTB/RIF para diagnóstico de casos novos de tuberculose e detecção de resistência à rifampicina no Sistema Único de Saúde – SUS. Disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2013/prt0048_10_09_2013.html. Acesso em: 22 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Helio Fraga. **Manual de bacteriologia da tuberculose**. 3ª. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2005. Disponível em: <http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/81/manual-de-bacteriologia-da-tuberculose-%5B81-080909-SES-MT%5D.pdf>. Acesso em: 22 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. 2011. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil.pdf. Acesso em: 12 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias**. 2008. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf. Acesso em: 12 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Experiências de Programas de Controle da Tuberculose: ‘Porque juntos iremos detectar, tratar e acabar com a tuberculose como problema de saúde pública no Brasil’. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 37, set., 2018. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2018/setembro/05/2018-041.pdf>. Acesso em: 22 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 8, 2017. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/23/2017-V-48-N-8-Indicadores->

priorit--rios-para-o-monitoramento-do-Plano-Nacional-pelo-Fim-da-Tuberculose-como-Problema-de-Sa--de-P--blica-no-Brasil.pdf. Acesso em: 22 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. **Boletim Epidemiológico**, v. 44, n. 13, 2014. Disponível em: <https://www.nescon.medicina.ufmg.br/biblioteca/imagem/boletim-controle-tuberculose.pdf>. Acesso em: 22 out. 2017.

BRITO, R. C.; GOUNDER, C.; LIMA, D. B. *et al.* Resistência aos medicamentos anti-tuberculosi de cepas *M. tuberculosis* isolados de pacientes atendidos em hospital geral de referencia para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 40, p. 425-432. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132004000400007>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132004000400007&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 10 nov. 2016.

CABIBBE, A. M.; CIRILLO, D. M. Best approaches to drug-resistance surveillance at the country level. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, n. 5, p. 40-41, 2016. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2016.09.010. Acesso em: 12 out. 2017.

CAMPBELL, P. J. *et al.* Molecular detection of mutations associated with first and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing in *M. tuberculosis*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2032–2041, 2011. DOI: 10.1128/AAC.01550-10. Acesso em: 12 out. 2017.

CAMPOS, C. E. D. *et al.* First Isolation of Mycobacterium kyorinense from Clinical Specimens in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2477–2478, 2012. DOI: 10.1128/JCM.00023-12. Acesso em: 12 out. 2017.

CAMPOS, H. S. Mycobacterium tuberculosis resistente: de onde vem a resistência? **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 7, n. 1, 1999. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?pid=S0103460X1999000100006&script=sci_arttext&tlng=es. Acesso em: 10 nov. 2016.

CANETTI, G. F. W.; KHOMENKO, A. *et al.* Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. **Bull World Health Organ**, v. 41, n. 1, p. 21 – 43, 1969. Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2427409/>. Acesso em: 12 out. 2017.

CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J. *et al.* Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. **Bull World Health Organ**, v. 29, n. 5, p.565–578, 1963. Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2555065/>. Acesso em: 12 out. 2017.

CARDOSO, R. F; COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G. P.; *et al.* Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates obtained in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3373–3381, 2004.DOI: 10.1128/AAC.48.9.3373-3381.2004. Acesso em: 22 out. 2017.

CAVUSOGLU, C.; TURHAN, A.; AKINCI, P.; SOYLER, I. Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2338-42, 2006.DOI: 10.1128/JCM.00425-06. Acesso em: 12 out. 2017.

CHAIYASIRINROJE, B.; AUNG, M. N.; MOOLPHATE, S. Prospective evaluation of simply modified MODS assay: an effective tool for TB diagnosis and detection of MDR-TB. **Infection and Drug Resistance**, v. 5, p. 79–86, 2012. DOI <https://doi.org/10.2147/IDR.S24295>. Acesso em: 12 out. 2017.

CHIA, B. S; LANZAS, F.; RIFAT, D. *et al.* Use of Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) to Detect Multidrug-Resistant Tuberculosis in Panama. **Plos One**, v. 7, n. 7, p. 1-7, 2012.DOI: 10.1371/journal.pone.0040456. Acesso em: 05 jun. 2017.

CHIANG, C. Y.; CENTIS, R.; MIGLIORI, G. B. Drug-resistant tuberculosis: Past, present, future. **Respirology**, v. 15, n. 3, p. 413-432, 2010. DOI: 10.1111 / j.1440-1843.2010.01738.x. Acesso em: 10 nov. 2016.

COELHO, M. B.; COSTA, E. R.; VASCONCELLOS, S. E. *et al.* Sequence and Structural Characterization of Tbnat Gene in Isoniazid-Resistant Mycobacterium Tuberculosis: Identification of New Mutations ML. **Mutation Research**, v.712, n. 1-2, p. 33-9, 2011. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514309>. Acesso em: 10 nov. 2016.

COLE, S.T, TELENTI, A. Durg resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Home European Respiratory Society**; v. 8, n. 2, p. 97-111, 1995. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/8590570>. Acesso em: 10 nov. 2016.

DALCOLMO, M. P.; SIQUEIRA, H. R.; FREITAS, F. A. D. Isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains arising from mutations in two different regions of the katG gene. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 8, p. 73-779, 2009. DOI: 10.1590/s1806-37132009000800009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132009000800009&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 10 nov. 2016.

DALCOLMO, M. P.; ANDRADE, M. K.; PICON, P. D. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, Suppl. 1, p. 34-42, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-89102007000800006> Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102007000800006. Acesso em: 10 nov. 2016.

DALCOLMO, M. P.; MELO, F. A. F.; PINTO, W. P. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: diretrizes brasileiras para tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 1, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132004000700002>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132004000700002. Acesso em: 10 nov. 2016.

DALCOLMO, M. P.; ROCHA, J. L.; BORGIA, L.; FEDELE, D.; MARQUES, M. G. Tuberculose multirresistente. **Pulmão RJ**, v. 17, n. 1, p. 27-32, 2008. Disponível em: <http://www.sopterj.com.br/wp->

content/themes/_sopsterj_redesign_2017/_educacao_continuada/curso_tuberculose_8.pdf.

Acesso em: 10 nov. 2016.

DAVID, H. L. Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. **Applied Microbiology**, v. 20, p. 810–814, 1970. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/aem/20/5/810.full.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2016.

DE BEENHOUWER, H.; LHIANG, Z.; JANNES, G. *et al.* Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. **Tuberculosis and Lung Disease**, v. 76, n. 5, p. 425-430, 1995. DOI:

[https://doi.org/10.1016/0962-8479\(95\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0962-8479(95)90009-8). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0962847995900098>. Acesso em: 10 nov. 2016.

DUROVNI, B.; SARACENI, V.; VAN DENHOF, S. *et al.* Impact of replacing smear microscopy with Xpert MTB/RIF for diagnosing tuberculosis in Brazil: a stepped-wedge cluster-randomized trial. **PLoS Medicine**, v. 11, n. 12, 2014. DOI:

10.1371/journal.pmed.1001766. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001766>. Acesso em: 10 nov. 2016.

ESPINAL, M. A.; LASZLO, A.; SIMONSEN, L.; Global trends in resistance to antituberculosis drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1294-1303, 2001.

DOI: 10.1056/NEJM200104263441706. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001766>. Acesso em: 10 nov. 2016.

EVANS, J.; STEAD, M. C.; NICOL, M. P.; SEGAL, H. Rapid genotypic assays to identify drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 11–16, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn433>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18940875>. Acesso em: 10 nov. 2016.

FREITAS, F. A. D.; SIQUEIRA, H. R.; ALBANO, R. M. Métodos Moleculares no diagnóstico da tuberculose e na resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas. **Pulmão RJ**, v. 18, n. 2, p. 96-101, 2009. Disponível em: http://www.sopterj.com.br/wp-content/themes/_sopterj_redesign_2017/_revista/2009/n_02/full.pdf#page=38. Acesso em: 10 nov. 2016.

FUJIWARA, P.; COOK, S. V.; RUTHEFORD, C. M. *et al.* A continuing survey of drug-resistant tuberculosis, New York city, April 1994. **Archives of Internal Medicine**, v. 157, n. 5, p. 531-6, 1997. DOI: doi:10.1001/archinte.1997.00440260077012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9066457>. Acesso em: 10 nov. 2016.

FURINI, A.; PEDRO, H.; RODRIGUES, J. *et al.* Detection of Mycobacterium complex by nested polymerase chain reaction in pulmonar and extrapulmonary specimens. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 39, n. 6, p. 711-718, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132013000600010>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132013000600711. Acesso em: 10 nov. 2016.

GILLESPIE, S. H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 267-274, 2002. DOI: 10.1128/AAC.46.2.267-274.2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796329>. Acesso em: 10 nov. 2016.

GUPTA, A.; PRAKASH, P.; SINGH, S. K.; ANUPURBA, S. Rapid genotypic detection of rpoB and katG gene mutations in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Northern India as determined by MAS-PCR. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 27, n. 1, p. 31-37, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.21558>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325741>. Acesso em: 10 nov. 2016.

HAAS, W. H.; SCHILKE, K.; BRAND, J. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 1601–1603, 1997. DOI: 10.1128/AAC.41.7.1601. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/aac/41/7/1601.full.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2016.

HANNA, B. A., EBRAHIMZADEH, A., ELLIOTT, L. B. *et al.* Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 748–752, 1999. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/jcm/37/3/748.full.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2016.

HAZBÓN, M. H.; BRIMACOMBE, M.; BOBADILLA DEL VALLE, M. *et al.* Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2640–2649, 2006. DOI: 10.1128/AAC.00112-06. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1538650/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

HEEP, M.; BRANDSTATTER, B.; RIEGER, U. *et al.* Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant to clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 107–110, 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.1.107-110.2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87688/> Acesso em: 10 nov. 2016.

HEEP, M.; BRANDSTÄTTER, B.; RIEGER, U. *et al.* Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster i region in rifampin-resistant clinical *mycobacterium tuberculosis* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 107–110, 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.1.107-110.2001. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/39/1/107>. Acesso em: 10 nov. 2016.

HEIFETS, L. B.; CANGELOSI, G. A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 3, n. 7, p. 564-81, 1999. DOI: 10.1128/JCM.39.1.107-110.2001. Disponível em: <http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/iuatld/10273719/v3n7/s5.pdf?expires=1584123962&id=0000&titleid=3764&checksum=6CC67BF87DC7A86D163693F25056F97> E. Acesso em: 10 nov. 2016.

HEIFETS, L. B.; CANGELOSI, G. A. Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium Tuberculosis: a neglected problem at the turn of the century. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 3, n. 7, p. 564-81, 1999. DOI: 10.1128/AAC.00112-06.

Disponível em:

<http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/iatld/10273719/v3n7/s5.pdf?expires=1584123208&id=0000&titleid=3764&checksum=88871AAF1057BD36BD6F5DB8A8019EF4>. Acesso em: 10 nov. 2016.

HELB, D.; JONES, M.; STORY, E. *et al.* Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 229–237, 2010. DOI: 10.1128/JCM.01463-09. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/48/1/229>. Acesso em: 10 nov. 2016.

HERRERA-LEÓN, L.; MOLINA, T.; SAÍZ, P. *et al.* New multiplex PCR for rapid detection of Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 144-147, 2005. DOI: 10.1128/AAC.49.1.144-147.2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87688/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

HEYM, B.; HONORÉ, N.; TRUFFOT-PERNOT, C. *et al.* Implications of multidrugresistance for future of short -course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. **Lancet**, v. 344, p. 293,1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)91338-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)91338-2). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7914261>. Acesso em: 10 nov. 2016.

HIJJAR, M. A. Controle das doenças endêmicas no Brasil: tuberculose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 23-36, 1994 Suplemento. Disponível em: http://www.sopterj.com.br/wp-content/themes/_sopterj_redesign_2017/_educacao_continuada/curso_tuberculose_1.pdf. Acesso em: 10 nov. 2016.

HIJJAR, M. A.; PROCÓPIO, M. J.; FREITAS, L. M. R. *et al.* Epidemiologia da tuberculose: importância no mundo, no Brasil e no Rio de Janeiro. **Pulmão RJ**, v. 14, n. 4, p. 310-4, 2005. Disponível em: <http://www.sopterj.com.br/wp->

content/themes/_sopsterj_redesign_2017/_revista/2005/n_04/08.pdf. Acesso em: 10 nov. 2016.

HILLEMANN, D.; WEIZENEGGER, M.; KUBICA, T.; RICHETER, E.; NIEMANN, S. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3699-3703, 2005. DOI: 10.1128/JCM.43.8.3699-3703.2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1233903/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

HILLEMANN, D.; RÜSCH-GERDES, S.; RICHTER, E. Evaluation of the genotype MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, 8, p. 2635-2640, 2007. DOI: 10.1128/JCM.00521-07. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1951233/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

HÖFLING, C. C.; PAVAN, E. M.; GIAMPAGLIA, C. M. *et al.* Prevalence of katG Ser315 substitution and rpoB mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 1, p. 87-93, 2005. Disponível em: <http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/iuatld/10273719/v9n1/s15.pdf?expires=1584125407&id=0000&titleid=3764&checksum=EB1600288CF91D3AF4DCE7286F7B4F2A>. Acesso em: 10 nov. 2016.

IMPERIALE, B. R.; CATALDI, A. A.; MORCILLO, N. S. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 15, p. 496–501, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5588/ijtld.10.0397>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21396209>. Acesso em: 10 nov. 2016.

KHOO, K. H.; DOUGLAS, E.; AZADI, P. *et al.* Truncated structural variants of lipoarabinomannan in ethambutol drug-resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. Inhibition of arabinan biosynthesis by ethambutol. **The Journal of Biological Chemistry**,

v. 271, n. 45, p. 28682-90, 1996. Disponível em:

<https://www.jbc.org/content/271/45/28682.full.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2016.

KIEPIELA, P.; BISHOP, K. S.; SMITH, A. N.; ROUX, L.; YORK, D. F. Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *ahpC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa.

Tubercle and Lung Disease, v. 80, n. 1, p. 47–56, 2000. DOI:

<https://doi.org/10.1054/tuld.1999.0231>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0962847999902319>. Acesso em: 10 nov. 2016.

KOCH, A.; MIZRAHI, V.; WARNER, D. F. The impact of drug resistance on

Mycobacterium tuberculosis physiology: what can we learn from rifampicin? **Emerging Microbes and Infections**, v. 3, n. 3, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/emi.2014.17>.

Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2014.17>. Acesso em: 10 nov. 2016.

KOX, L. F. F.; RHIENTHONG, D.; MIRANDA, A. M. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.

32, n. 3, p. 672-8, 1994. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/32/3/672.short>. Acesso em: 10 nov. 2016.

KRITSKI, A. L. Emergência de tuberculose resistente: Renovado desafio. **Jornal**

Brasileiro de Pneumologia, v. 36, n. 2, p. 157-158, 2010. Disponível em: [https://s3-sa-east-1amazonaws.com/publisher.gn1.com.br/jornaldepneumologia.com.br/pdf/2010_36_2_1_english.pdf](https://s3-sa-east-1.amazonaws.com/publisher.gn1.com.br/jornaldepneumologia.com.br/pdf/2010_36_2_1_english.pdf). Acesso em: 10 nov. 2016.

KULKARNI, S.; SINGH, P.; MEMON, A. *et al.* An in-house multiplex PCR test for the detection of mycobacterium tuberculosis, its validation & comparison with a single target TB-PCR-Kit. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 5, p. 788-94, 2012.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3401715/?report=reader>. Acesso em: 10 nov. 2016.

KULKARNI, S.; SINGH, P.; MEMON, A. An in-house multiplex PCR test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*, its validation & comparison with a single target TB-PCR kit. **The Indian journal of medical research**, v. 135, n. 5, p. 788–794, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3401715/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

LAURENZO, D.; MOUSA, S. A. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. **Acta Tropica**, v.119, p. 5-10, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X11000787?via%3Dihub>. Acesso em: 10 nov. 2016.

LEÃO, S. C.; MARTIN, A.; MEJIA, G. I. *et al.* Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. **Vanden Broele, Brugge, Belgium**, p. 113-116, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Sylvia_Leao/publication/27598068_Practical_handbook_for_the_phenotypic_and_genotypic_identification_of_mycobacteria/links/0fcfd50ddb09ecf3b000000.pdf. Acesso em: 10 nov. 2016.

LEE, R. S.; BEHR, M. A. The implications of whole-genome sequencing in the control of tuberculosis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 2, p. 47-62, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1177/2049936115624630>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2049936115624630>. Acesso em: 10 nov. 2016.

LIMA, C. H. S.; BISPO, M. L. F.; DE SOUZA, M. V. N. Pirazinamida: um fármaco essencial no tratamento da tuberculose. **Revista Virtual de Química**, v. 3 n. 3, p. 159-180, 2011. Disponível em: <http://www.uff.br/rvq>. Acesso em: 10 nov. 2016.

LIMA, J. F.; MONTENEGRO, L. M.; MONTENEGRO, R. A. *et al.* Performance of nested PCR in the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in blood samples of pediatric patients. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 7, p. 690-7, 2009. Disponível em: https://s3-sa-east-1.amazonaws.com/publisher.gn1.com.br/jornaldepneumologia.com.br/pdf/2009_35_7_11_english.pdf. Acesso em: 10 nov. 2016.

LIMA, K. V.; LOPES, M. L.; LOUREIRO, E. C. *et al.* Nested-PCR for gene that encodes the antigen b applied to the diagnosis of pulmonary tuberculosis [Article in Portuguese].

Rev Soc. Bras. Med Trop. v. 40, n. 2, p. 212-5, 2007. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000200013>. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822007000200013&lng=pt&tlng=pt)

[86822007000200013&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822007000200013&lng=pt&tlng=pt). Acesso em: 10 nov. 2016.

LIMA, T. M.; BELOTTI, N. C. U.; NARDI, S. M. T.; PEDRO, H. da S. P. Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 8, n. 2, p. 67-78, 2017. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v8n2/2176-6223-rpas-8-02-00065.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2016.

LING, D. I.; ZWERLING, A. A.; PAI, M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrugresistant tuberculosis: a systematic review. **European Respiratory Journal**, v. 32, p. 1165–74, 2008. DOI: 10.1183/09031936.00061808. Disponível em: <https://erj.ersjournals.com/content/32/5/1165>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MACKAY, I. M. *et al.* Real-time PCR in microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infectious**, v. 10, n. 3, p. 190-212, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MARÍN, M.; VIEDMA, D.; RUÍZ-SERRANO, M. J.; BOUZA, E. Rapid direct detection of multiple rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by Real-Time PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4293-4300, 2004. DOI: 10.1128/AAC.48.11.4293-4300.2004. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/48/11/4293.short>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MARTINS, E. S. J. **Avaliação de modificações no método de redução de nitrato visando a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010. Dissertação. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/4835>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MASHTA, A.; MISHRA, P.; PHILIPOSE, S. *et al.* Diagnosis of tuberculosis: the experience at a specialized diagnostic laboratory. **Journal of Negative Results in BioMedicine**, v. 18; n. 10, p. 16, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/1477-5751-10-16.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MATOS, E. D.; LEMOS, A. C. M.; BITTENCOURT, C.; MESQUITA, C. L. Anti-tuberculosis drug resistance in strains of *M. tuberculosis* isolated from patients in a tertiary hospital in Bahia. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 331–33, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702007000300007>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702007000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 10 nov. 2016.

MEDEIROS, R. C.; CARDOSO, I. M.; JACCARDE, A. P. B. *et al.* Avaliação intra-observador e inter-observadores do Sistema de Classificação de Landim para estenose vertebral lombar. **COLUNA/COLUMNNA**, v. 8, n. 1, p. 63-67, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1808-18512009000100012>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-18512009000100012&lng=en&tlng=en. Acesso em: 10 nov. 2016.

MENDES, J. M.; LOURENCO, M. C.; FERREIRA, R. M. C.; FONSECA, L. S.; SAAD, M. H. F. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from sputum samples from symptomatic out patients-Complexo de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 5, p. 579–582, 2007. DOI: 10.1590/S180637132007000500014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132007000500014. Acesso em: 10 nov. 2016.

MIDDLEBROOK, G.; COHN, M. L.; SCHAEFER, W. B. Studies on Isoniazid and Tubercle Bacilli - III. The Isolation, Drug-Susceptibility, and Catalase-Testing of Tubercle Bacilli from Isoniazid - Treated Patients. **American Review of Tuberculosis**, v. 70, n. 5, p. 852–872, 1954. Disponível em: <https://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/art.1954.70.5.852>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MILLER, M. B.; POPOWITCH, E. B.; BACKLUND, M. G.; AGER, E. P. Performance of Xpert MTB/RIF assay and IS6110 real-time PCR for *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3458-62, 2011. DOI: 10.1128/JCM.05212-11. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/49/10/3458.abstract>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MINION, J.; LEUNG, E.; MENZIES, D.; PAI, M. Microscopic-observation drug susceptibility and thin layer agar assays for the detection of drug resistant tuberculosis: a systematic review and systematic review. **Lancet**, v. 10, n. 10, p. 688 –98, 2010. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70165-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70165-1). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(10\)70165-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(10)70165-1/fulltext). Acesso em: 10 nov. 2016.

MITCHISON, D. A.; NUNN, A. J. Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 133, p. 423-30, 1986. Disponível em: <https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/arrd.1986.133.3.423>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MOKROUSOV, I.; OTTEN, T.; VYSHNEVSKIY, B.; NARVSKAYA, O. Allele-Specific *rpoB* PCR Assays for Detection of Rifampin Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Smears. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2231–2235, 2003. DOI: 10.1128/AAC.47.7.2231-2235.2003. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/47/7/2231>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MOKROUSOV, I.; NARVSKAYA, O.; LIMESCHENKO, E.; OTTEN, T.; VYSHNEVSKIY, B. Detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by multiplex allele-specific PCR assay targeting embB306 mutations. **Journal of Clinical**

Microbiology, v. 40, n. 5, p. 1617–20, 2002. DOI:10.1128/JCM.40.5.1617-1620.2002.

Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/40/5/1617>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MOKROUSOV, I.; OTTEN, T.; FILIPENKO, M. *et al.* Detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by a multiplex allele-specific PCR assay

Targeting *katG* Codon 315 Variation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2509–2512, 2002. DOI: 10.1128/JCM.40.7.2509-2512.2002. Disponível em:

<https://jcm.asm.org/content/40/7/2509>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MOKROUSOVA, I.; BHANUB, N. V.; SUFFYS, P. N. Multicenter evaluation of reverse line blot assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical

isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, n. 3, p. 323–335, 2004. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.02.006>. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/8570763_Multicenter_evaluation_of_reverse_line_blot_assay_for_detection_of_drug_resistance_in_Mycobacterium_tuberculosis_clinical_isolates. Acesso em: 10 nov. 2016.

MONTEIRO, P. H. T.; MARTINS, M. C.; UEKI, S. Y. M.; GIAMPAGLIA, C. M. S.;

TELLES, M. A. S. Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **The Brazilian Journal of**

Microbiology, v. 34, n. 2, p. 171–4, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1590/S1517-](https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000200016)

83822003000200016. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822003000200016&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

83822003000200016&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 10 nov. 2016.

MORGAN, M.; KALANTRI, S.; FLORES, L. *et al.* A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic

review and systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, p. 62, 2005. Disponível em:

<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-5-62>. Acesso em: 10

nov. 2016.

MULLIS, K. B. **Polymerase chain reaction**: Making DNA accessible. Disponível em: <http://www.karymulis.com/pcr.shtml>. Acesso em: 10 nov. 2019.

MURRAY, P. R.; BARON, E.; PFALLER, M. *et al.* **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington, DC: ASM, 1999. Disponível em: <https://www.worldcat.org/title/manual-of-clinical-microbiology/oclc/39914150>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MUSA, H.R.; AMBROGGI, M.; SOUTO, A.; ÄNGEBY, K.A.K. Drug Susceptibility Testing Of *Mycobacterium Tuberculosis* By A Nitrate Reductase Assay Applied Directly On Microscopy-Positive Sputum Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3159–3161, 2005. DOI: 10.1128/JCM.43.7.3159-3161.2005. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/43/7/3159>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MUZAFFAR, R.; BATOOL, S.; AZIZ, F.; NAQVI, A.; RIZVI, A. Evaluation of the FASTPlaqueTB assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 6, n. 7, p. 635-40, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12102304>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MYO, T. Z.; NOR, A. E.; ZAW, L. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gen associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 5, p. 605-610, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034118300418>. Acesso em: 10 nov. 2016.

NOGUEIRA, C. L.; WILDNER, L. M.; SENNA, S. G. *et al.* Alternative sputum preparation to improve polymerase chain reaction assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 16, n. 6, p. 783-7, 2012. DOI: <https://doi.org/10.5588/ijtld.11.0644>. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/2012/00000016/00000006/art00014;jsessionid=37u8v07xxp8r1.x-ic-live-01> Acesso em: 10 nov. 2016.

PAGE GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water PAGE GelRed™ staining of DNA in agarose gels / Catalog Number: 41008-T, 41008-500uL Unit Size: 100 uL, 500 UI/ Concentration: 10,000X in water. Disponível em: <https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/08/PI-41008.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2016.

PALOMINO, J. C. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 103-112009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00555.x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femspd/article/56/2/103/516978>. Acesso em: 10 nov. 2016.

PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis**: from basic science to patientcare. Belgium, Brazil and Argentina; FlyingPublisher, 2007. Disponível em: www.tuberculosistextbook.com. Acesso em: 10 nov. 2016.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; GROLL, A. V.; PORTAELS, F. Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.06.015>. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/18627779>. Acesso em: 10 nov. 2016.

PANKHURST, L. J. *et al.* Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial Diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 4, n. 1, p. 49e58, 2016. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00466-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00466-X). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600\(15\)00466-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(15)00466-X/fulltext). Acesso em: 10 nov. 2016.

PERIZZOLO, P. F.; COSTA, E. R. D.; RIBEIRO, A. W.; SPIESC, F. S.; RIBEIRO, M. O.; DIAS, C. F.; UNIS, G.; SILVA, P. A.; GOMES, H. M.; SUFFYS, P. N.; ROSSETTI, M. L. R. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. **Tuberculosis**, v. 92, p. 56–59, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.09.008>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/51723545_Characteristics_of_multidrug-resistant_Mycobacterium_tuberculosis_in_southern_Brazil. Acesso em: 10 nov. 2016.

PERSUBN, D. C. Biologia molecular: inovações e perspectivas na avaliação laboratorial de doenças infecciosas. *In*: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL-FILHO, V. **Fármacos e Medicamentos**: Uma abordagem Multidisciplinar. Ed. Santos: São Paulo, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000192&pid=S1516-0572201300020001000029&lng=pt. Acesso em: 10 nov. 2016.

PETRI JÚNIOR, W. A. Quimioterapia da tuberculose, complexo *Mycobacterium avium* e hanseníase. *In*: Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L. **Goodman & Gilman**: as bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. p. 1083-1101.

PIERRE, C.; OLIVIER, C.; LECOSSIER, D.; BOUSSOUGANT, Y.; YENI, P.; HANCE, A. J. Diagnosis of primary tuberculosis in children by amplification and detection of mycobacterial DNA. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 147, n. 2, p. 420-4, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1164/ajrccm/147.2.420>. Disponível em: <https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm/147.2.420>. Acesso em: 10 nov. 2016.

PINTO, M.; TRAJMAN, A.; STEFFEN, R.; ENTRINGER, A. P. Cost analysis of nucleic acid amplification for diagnosing pulmonary tuberculosis, within the context of the Brazilian Unified Health Care System. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 6, p. 1-3, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1806-37562015000004524>. Disponível em: http://www.jornaldepneumologia.com.br/detalhe_artigo.asp?id=2888. Acesso em: 10 nov. 2016.

PORTILLO-GÓMEZ, L.; MORRIS, S. L.; PANDURO, A. Rapid and efficient detection of extra-pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. 4, p. 361-70, 2000. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtd/2000/00000004/00000004/art00014#>. Acesso em: 10 nov. 2016.

PORTO, A. Representações sociais da tuberculose: estigma e preconceito. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, Suppl 1, p. 43-9, 2007. DOI: 10.1590/s003489102007000800007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v41s1/6493.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2016.

PRÁTICA CLÍNICA. **Calculadora**: cálculo amostral. Disponível em:

<https://praticaclinica.com.br/anexos/ccolaborativa-calculo-amostal/ccolaborativa-calculo-amostal.php>. Acesso em: 12 out. 2017.

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

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003479732001000400006. Acesso em: 10 nov. 2016.

RAJ, A.; SINGH, N.; GUPTA, K. B. *et al.* Comparative Evaluation of Several Gene Targets for Designing a Multiplex-PCR for an Early Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis.

Yonsei Medical Journal, v. 57, n. 1, p. 88–96, 2016. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4696977/>. Acesso em: 20 fev. 2017.

RAMASWAMY, S.; MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in mycobacterium tuberculosis: 1998 update. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 79, p. 3–29, 1998. DOI:

<https://doi.org/10.1054/tuld.1998.0002>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0962847998900028>. Acesso em: 10 nov. 2016.

RAMYA, B.; GOPALSAMY, S.; TESSA, A. *et al.* Improved detection of Mycobacterium tuberculosis using two independent PCR targets in a tertiary care centre in South India.

Journal of Infection in Developing Countries, v. 6, n. 1, p. 46-52, 2012. DOI:

<https://doi.org/10.3855/jidc.1302>. Disponível em:

<https://jidc.org/index.php/journal/article/view/22240428>. Acesso em: 10 nov. 2016.

RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: molecular perspectives. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 195-209, 1998.

DOI: 10.3201/eid0402.980207. Disponível em:

<https://europepmc.org/article/pmc/pmc2640153>. Acesso em: 10 nov. 2016.

RAVIBALAN, T.; SAMROT, A. V.; MARUTHAI, K. *et al.* Evaluation of multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of katG (S315T) gene mutation in Mycobacterium tuberculosis isolates from Puducherry, South India. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 9, n. 3, 2015, p. 2339. Disponível em:

<https://go.gale.com/ps/anonymous?id=GALE%7CA436439735&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=09737510&p=AONE&sw=w>. Acesso em: 10 nov. 2016.

REDE-TB: **Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose**. Disponível em:

<http://www.redetb.org.br/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

RIEDER, H.L. **Interventions for tuberculosis control and elimination**. IUATLD: Paris, 2002. ISBN: 2-914365-11-X. Disponível em:

[http://www.tbonline.info/media/uploads/documents/interventions_for_tuberculosis_control_and_elimination_\(2002\).pdf](http://www.tbonline.info/media/uploads/documents/interventions_for_tuberculosis_control_and_elimination_(2002).pdf). Acesso em: 10 nov. 2016.

RISKA, P. F.; JACOBS, W. R. J. R.; ALLAND, D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. 2, Supp. L, p. 4-10, 2000. Disponível em:

<https://europepmc.org/article/med/10688142>. Acesso em: 10 nov. 2016.

ROSSAU, R.; TRAORE, H.; DE BEENHOUWER, H. *et al.* Evaluation of the INNO-LiPA-RIF. TBassay a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 10, p. 2093-2098, 1997. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164076/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. S.

Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 4, p. 525-532, 2002. Disponível em: <https://www.scielosp.org/article/rsp/2002.v36n4/525-532/>.

Acesso em: 10 nov. 2016.

ROSSO, F.; MICHELON, C. T.; SPERHACKE, R. D. *et al.* Evaluation of real-time PCR of patient pleural effusion for diagnosis of tuberculosis. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 4, p. 279, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-279>. Disponível em: <https://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-4-279>. Acesso em: 10 nov. 2016.

RUFFINO Netto, A. Controle da tuberculose no Brasil atividades implementadas em 1999, **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 7, n., 2, jul.-dez., 1999. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/bps/v7n2/v7n2a07.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2017.

SALEM, J. I.; CARVALHO, C. M.; OGUSKU, M. M. PKO: alternative method for isolating *Mycobacterium* from sputum. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 3, p. 419-424, 2007. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5475>. Acesso em: 10 nov. 2016.

SALFINGER, M.; HEIFETS, L. B. Determination of Pyrazinamide MICs for *Mycobacterium Tuberculosis* at Different pHs by the Radiometric Method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, p. 1002, 1988. DOI: 10.1128/aac.32.7.1002. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3142340/?from_single_result=Antimicrob.+AgentsChemoter.1988%2C+32%2C+1002. Acesso em: 10 nov. 2016.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA: sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/271968/?from_single_result=DNA+sequencing+with+chain+terminating+inhibitors+Proc.+Nati.+Acad.+Sci.+USA+Vol.+74%2C+No.+12%2C+pp.+5463-5467%2C+December+1977. Acesso em: 10 nov. 2016.

SANTOS, V. S. O que é mutação? **Brasil Escola**. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/o-que-e/biologia/o-que-e-mutacao.htm>. Acesso em: 14 ago. 2019.

SATO, D. N. **Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene da luciferase**. 2003. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 2003. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100761/sato_dn_dr_araiq.pdf;jsessionid=177818F7A46EACA27CE0762433CEB038?sequence=1. Acesso em: 10 nov. 2016.

SAUNDERS, N. A. Real-time PCR. **Methods in Molecular Biolog**, v. 266, p. 191-211, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1385/1-59259-763-7:191>. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE - SMS. **Tuberculose**. Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.rio.rj.gov.br/web/sms/exibeconteudo?id=4277320>. Acesso em: 10 nov. 2016.

SEIFERT, M.; CATANZARO, D.; CATANZARO, A.; RODWELL, T. C. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. **PLOS ONE**. DOI: 10.1371/journal.pone.0119628 March 23, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119628>. Acesso em: 10 nov. 2016.

SEKIGUCHI, J.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ, E. *et al.* Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 179-92, 2007. DOI: 10.1128/JCM.00750-06. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/45/1/179.abstract>. Acesso em: 10 nov. 2016.

SHARMA, S. K.; SETHI, S.; SHARMA, M. *et al.* Development and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* from pulmonary specimens. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 44, n. 10, p. 739-44, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.684219>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00365548.2012.684219?journalCode=infid19>. Acesso em: 10 nov. 2016.

SIDDIQI, S. H.; RUESCH-GERDES, S. **MGIT procedure manual**: for BACTEC MGIT 960 TB System. India: Foundation for Innovative New Diagnostics, 2006. Disponível em: https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf. Acesso em: 10 nov. 2016.

SILVA, M. S.; SENNA, S. G.; RIBEIRO, M. O. *et al.* Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4471-4, 2003. DOI: 10.1128/jcm.41.9.4471-4474.2003. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/41/9/4471>. Acesso em: 10 nov. 2016.

SILVA, P. E. A. da; VON GROLL, A.; MARTIN, A.; Palomino, J. C. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 63, p. 1–9, 2011. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00831.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1574-695X.2011.00831.x>. Acesso em: 20 fev. 2017.

SIU, G. K.; TAM, Y. H.; HO, P. L. *et al.* Direct detection of isoniazid-resistant mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 69, n. 1, p. 51-8, 2011. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21146714/?from_term=Siu+GK&from_cauthor_id=21146714&from_pos=1. Acesso em: 10 nov. 2016.

SIU, G. K.; ZHANG, Y.; LAU, T. C. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 730–733, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkq519>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29706316>. Acesso em: 10 nov. 2016.

SMITH, S. E.; KURBATOVA, E. V.; CAVANAUGH, J. S.; CEGIELSKI, J. P. Global Isoniazid Resistance Patterns in Rifampin-Resistant and Rifampin-Susceptible Tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 16, n. 2, p. 203-5, 2012.

DOI:10.5588/ijtld.11.0445. Disponível em:

<https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/2012/00000016/00000002/art00012>.

Acesso em: 10 nov. 2016.

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

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11325882/?from_term=Molecular+diagnosis+of+mycobacteria.&from_pos=4. Acesso em: 10 nov. 2016.

SOUZA, L. R. M. F; FAINTUCH, S.; BEKHOR, D. *et al.* Interobserver agreement on non-contrast computed tomography interpretation for diagnosis of urolithiasis in patients with acute flank pain. **Radiologia Brasileira**, v. 39, 5, p. 341–344, 2006. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S0100-39842006000500008>. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-39842006000500008&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 10 nov. 2016.

SOUZA, M. A. de. **Avaliação do desempenho da PCR Multiplex alelo específico para detecção de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência a Rifampicina e Isoniazida, a partir de amostra clínica**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/2565>. Acesso em: 10 nov. 2016.

TAGHAVI, K.; FARNIA, P.; VARAHRAM, M. *et al.* A Rapid Detection of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by a Single Multiplex Allele-specific Polymerase Chain Reaction Assay. **Cell Journal**, v. 13, n. 2, p. 97–102, 2011. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508230>. Acesso em: 10 nov. 2016.

TEIXEIRA, R. L. F.; MORATO, R. G.; CABELLO, P. H. *et al.* Genetic polymorphisms of NAT2, CYP2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in Brazilian TB patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 6, p. 716-724, 2011. DOI: 10.1590/s0074-02762011000600011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762011000600011&script=sci_abstract. Acesso em: 10 nov. 2016.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F. *et al.* Detection of Rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Lancet**, v. 341, p. 647-650, 1993. DOI: 10.1016/0140-6736(93)90417-F. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/15102821_Detection_of_rifampicin-resistance_mutations_in_Mycobacterium_tuberculosis. Acesso em: 10 nov. 2016.

THO, D. Q.; HA, D. T.; DUY, P. M. *et al.* Comparison of MAS-PCR and GenoType MTBDR assay for the detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 12, p. 1306-12, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18926042>. Acesso em: 10 nov. 2016.

VADWAI, V.; SHETTY, A.; RODRIGUES, C. Using likelihood ratios to estimate diagnostic accuracy of a novel multiplex Nested PCR in extra-pulmonary tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 6, n. 2, p. 240-7, 2012. DOI: 10.5588/ijtld.11.0322. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/2012/00000016/00000002/art00021>. Acesso em: 10 nov. 2016.

VADWAI, V.; SHETTY, V.; RODRIGUES, C. Multiplex allele specific PCR for rapid detection of extensively drug resistant tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 92, p. 236-242, 2012. DOI: 10.1016/j.tube.2012.01.004. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/22342856>. Acesso em: 10 nov. 2016.

VALIM, A. R.; Rossetti, M. L.; Ribeiro, M. O.; Zaha, A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Brazil. **Journal of Clinical**

Microbiology, v. 38, p. 3119–3122, 2000. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87207/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

VAN RIE, A.; PAGE-SHIPPI, L.; SCOTT, L.; SANNE, I.; STEVENS, W. Xpert(®)

MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries:

hype or hope? **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 7, p. 937-46, 2010.

DOI: 10.1586/erm.10.67. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/erm.10.67>. Acesso em: 10 nov. 2016.

VIEDMA, G. de. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, p. 349–359, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00695.x>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12848747>. Acesso em: 10 nov. 2016.

VIEDMA, G. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, p. 349-359, 2003. DOI: [10.1046/j.1469-0691.2003.00695.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00695.x). Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1469-0691.2003.00695.x>. Acesso em: 10 nov. 2016.

WALUSIMBI, S.; BWANGA, F.; COSTA, A. D. *et al.* Meta-analysis to compare the accuracy of GeneXpert. MODS and the WHO 2007 algorithm for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 507, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24172543> Acesso em: 10 nov. 2016.

WATSON, J. D; CRICK, F. H. C. A structure for deoxyribosenucleicacid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738. Disponível

em:<http://www.nature.com/nature/dna50/watsoncrick.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2016.

WHO. **Anti-tuberculosis drug resistance in the world**. Report n. 2 Prevalence and Trends, 2000. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20003028606>. Acesso em: 10 nov. 2016.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Task Force Outlines Measures to Combat XDR-TB Worldwide**. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 10 nov. 2016.

WILSON, M. L. Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection and drug susceptibility testing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 173, n. 6, p. 812-819, 2013. DOI: 10.5858/arpa.2011-0578-RA. Disponível em: <https://www.archivesofpathology.org/doi/full/10.5858/arpa.2011-0578-RA>. Acesso em: 10 nov. 2016.

WILSON, M. L. Recent advances in the laboratory detection of Mycobacterium tuberculosis complex and drug resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 11, p. 1350-1355, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cir146>. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/52/11/1350/407147>. Acesso em: 10 nov. 2016.

Working in Epidemiology. **Aplicativo**. Disponível em: <http://www.winepi.net>. Acesso em: 05 mar. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Endorses new rapid tuberculosis test** Geneva. Disponível em: www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/. Acesso em: 10 nov. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis report**. Geneva: World Health Organization, 2018. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/acesso 06/06/2018](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/acesso%2006/06/2018). Acesso em: 10 nov. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report2017**. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/acesso 06/06/2018](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/acesso%2006/06/2018). Acesso em: 10 nov. 2016./

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control**: WHO report. 2010. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acesso em: 10 nov. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2012**. Disponível em: <http://www.who.int/publications/guidelines/tuberculosis/en/>. Acesso em: 10 jun. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control**: a short update to the 2009 report. Disponível em: <http://www.who.int/tb/relatório>. Acesso em: 10 nov. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Southern Africa is moving swiftly to combat the threat of XDR–TB. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 84, n. 12, p. 921-1000, 2006. Disponível em: <https://www.who.int/bulletin/volumes/84/12/06-011206/en/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Tuberculosis**: XDR-TB– The facts Available. Disponível em: https://www.who.int/tb/challenges/XDR/facts_nov_2007_en.pdf. Acesso em: 10 nov. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Global Plan to Stop TB 2006–2015**. Disponível em: https://www.who.int/tb/features_archive/global_plan_to_stop_tb/en/. Acesso em: 10 nov. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/INTERNATIONAL UNION AGAINST. **Tuberculosis and Lung Disease. AntiTuberculosis Drug Resistance in the World 1994-1997**. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global/en/acesso_06/06/2018. Acesso em: 10 nov. 2016.

YANG, Z.; DURMAZ, R.; YANG, D. *et al.* Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, p. 201–8, 2005. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2005.06.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16243477/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

YENDAPALLY, R.; LEE, R. E. Design, synthesis, and evaluation of novel ethambutol analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 5, p. 1607-1611, 2008.

DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.01.065. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2276401/>. Acesso em: 10 nov. 2016.

ZHANG, Y; YEW, W. W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

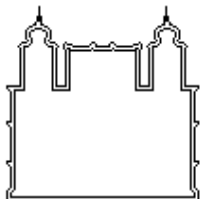
International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, v. 13, n. 11, p. 1320-1330, 2009. Disponível em:

<https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/2009/00000013/00000011/art00004#>.

Acesso em: 10 nov. 2016.

APENDICES

Termo de confiabilidade



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Referência Professor Hélio Fraga

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP**TERMO DE CONFIABILIDADE**

Declaro para devido fins que os dados clínicos assim como a identidade dos pacientes envolvidos nesse estudo, serão preservados e não serão usadas na análise final da metodologia proposta. Nenhum questionário ou documentação clínica serão usados no estudo. Apenas serão usados dados referentes ao teste de sensibilidade a droga como padrão comparativo das técnicas fenotípicas e genotípicas na análise das mutações relacionadas a resistência do *M.tuberculosis* das principais drogas usadas no tratamento da tuberculose (Rifampicina e Isoniazida).

As informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do presente projeto.

Assim como eu, os pesquisadores envolvidos no presente estudo se comprometem a preservar as informações garantindo o sigilo e a privacidade dos pacientes.

Rio de Janeiro, 24 de Setembro de 2019.

TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE COM A PESQUISA

Eu, **Marcia Aparecida da Silva Pereira**, aluna de Mestrado profissional vinculada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, INI-FIOCRUZ, matrícula número 114411-652017. Comprometo-me a seguir fielmente a Metodologia descrita no Projeto de Pesquisa Intitulado: “Diagnostico Rápido da tuberculose multiresistente por Método Molecular” sob orientação da PhDa Sandra Cardoso Wagner– INI e Doutora Fátima Cristina O. Fandinho–CRPHF

O estudo será realizado nas dependências do Laboratório do Centro de Referencia Nacional em Bacteriologia da tuberculose Professor Helio Fraga. De acordo com as normas de biossegurança, Comprometo-me, ao fim do estudo, enviar relatório com a conclusão do estudo ao CEP-INI. Além disso, DECLARO:

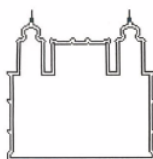
- ☞ 1 - Que vou pautar minhas ações, conforme os aspectos éticos da pesquisa
- ☞ 2 - Que vou utilizar os EPIs (Equipamentos de Proteção Individual) e boas práticas de laboratório necessários para evitar riscos que inviabilize a pesquisa.
- ☞ 3 - Que em caso de dúvidas, ou mesmo de um acontecimento adverso, estou ciente que devo prontamente procurar meus Orientadores e lhe informar todos os detalhes;
- ☞ 4 - Que permito ao Centro de Referencia Professor Helio Fraga (CRPHF), ao final do meu trabalho de pesquisa, publicar em revista o resultado desta, bem como em evento científico próprio, conforme a conveniência.
- ☞ 5 - Que autorizo que a Comissão de Pesquisas do CEP-INI fiscalize meus procedimentos metodológicos a qualquer momento;
- ☞ 6 - Que em caso de alteração da Metodologia empregada na pesquisa, comunicarei imediatamente o fato ao CEP-INI, para conhecimento e providências que este julgar pertinentes;
- ☞ 7 - Que assumo o compromisso de manter em sigilo os dados que direta ou indiretamente tiver acesso em razão do trabalho de pesquisa realizado nas

dependências do CRPHF, seja em documentos sob guarda do CRPHF ou em dados inseridos em seu sistema informatizado, especificamente sobre a identificação pessoal de paciente atendido nas dependências do Centro, não podendo em hipótese alguma fazer uso ou referência a qualquer um destes dados, no projeto de pesquisa ou fora dele.

Rio de Janeiro, 25 de junho de 2018.

Marcia Aparecida da Silva Pereira
Matricula Mest-INI/ 114411-652017.
Marcapas2011@gmail.com
[Tel: 98411-7479](tel:98411-7479)

TERMO DE COMPROMISSO NA UTILIZAÇÃO DO BANCO DE CEPAS MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DO LAB/CRPHF



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Referência Professor Hélio Fraga



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

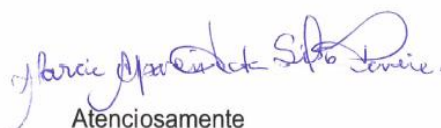
Rio de Janeiro, 25 de junho de 2018.

Termo de Compromisso na Utilização do Banco de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* do LAB/CRPHF

Eu, **Marcia Aparecida da Silva Pereira**, do Laboratório de Referência Nacional em Bacteriologia da Tuberculoses pertencente ao departamento do Centro de Referência Professor Helio Fraga da Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz.(CRPF-ENSP-Fiocruz), no âmbito do projeto de pesquisa intitulado “**Detecção rápido da tuberculose multiresistente por método Molecular**”, vinculado ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional do Instituto de Nacional Pesquisa Clínica Evandro Chagas, comprometo-me com a utilização e preservação das **culturas** proveniente do banco de cepas *Mycobacterium tuberculosis*,(MTB) sensíveis (S) resistentes (R) e/ou multidrogaresistente (MDR) do CRPHF-ENSP-Fiocruz”, obtidos no período de 1996 a 2000 a fim de obtenção dos objetivos propostos no presente projeto.

Comprometo-me a manter as boas praticas de laboratório para garantir a qualidade e preservação das culturas que serão selecionadas para a pesquisa, além disso, caso seja necessário, acessarei o Sistema de Gerenciamento do laboratório (**GAL**) somente para buscar o resultado do teste de sensibilidade das culturas selecionadas no presente estudo, para fins de comparar o resultado com a metodologia proposta.

Declaro entender que é minha a responsabilidade não repassar os dados coletados em sua íntegra, ou parte dele, à pessoas não envolvidas na equipe da pesquisa. Por fim, comprometo-me com a guarda, em local seguro qualquer outra informação que venha a associar a cultura do MTB com o individuo com TB, atendido no CRPHF. Comprometo-me ainda, utilizar os resultados apenas para cumprimento dos objetivos previstos na pesquisa aqui referida.



Atenciosamente

Marcia Aparecida da Silva Pereira

Laboratório de Referencia Nacional de bacteriologia da Tuberculose

Setor: Diagnóstico Molecular da tuberculose

CRPHF-ENSP/FIOCRUZ-RJ

marcapas2011@gmail.com

2441-6802/6882 /3673-1238/ 98411-7479



Fátima Moreira Martins

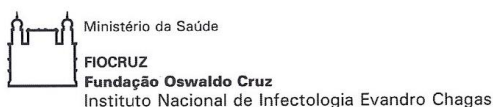
Chefe do Serviço de Laboratório

CRPHF/ENSP/FIOCRUZ

Mat. SIAPF Nº 236032

CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA/ENSP/FIOCRUZ
Estrada de Curicica nº 2000 – Jacarepaguá – CEP 22780 192 – Rio de Janeiro – RJ
TEL :21- 2448 6834/2448 6828
E mail: crphflab@ensp.fiocruz.br

JUSTIFICATIVA DA NECESSIDADE DO PARECER DA DISPENSA DA ANÁLISE ÉTICA AO CEP/ENSP



Rio de Janeiro, 27 de junho de 2019

Assunto: Justificativa da necessidade do parecer da dispensa da análise ética
ao CEP/ENSP

Prezados (as) Coordenadores do Comitê de Ética em Pesquisa ENSP-
FIOCRUZ,

Nós, Dr. Sandra Wagner e Dr. Fatima Fandinho, pesquisadores do INI-Fiocruz e CRPHF-ENSP respectivamente e Marcia Aparecida da Silva Pereira, aluna do programa de Pós Graduação Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica-INI, solicitamos o "Parecer de Dispensa de análise ética da presente pesquisa intitulada ***"Detecção rápida da tuberculose multidrogarresistente por método Molecular,*** por este não tratar de pesquisa envolvendo seres humanos e sim culturas do agente causador da doença. Informo ainda que a pesquisa teve a dispensa do comitê de ética em pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas-INI-Fiocruz. Conforme cópia do email (anexo). Envio também em anexo o projeto na íntegra junto com os Termos de Compromisso com a pesquisa e utilização do banco de cepas do CRPHF para melhor compreensão e esclarecimento do estudo. Por esses motivos solicitamos o **parecer de dispensa ética** a essa conceituada comissão:



Sandra Wagner Cardoso

Pesquisadora Responsável

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Evandro Chagas

Rio de Janeiro, 24 de Setembro de 2019

Assunto: Justificativa da necessidade do parecer da dispensa da análise ética ao CEP/INI

Prezados (as) Coordenadores do Comitê de Ética em Pesquisa-INI-FIOCRUZ,

Nós, Dr. Sandra Wagner e Dr. Fatima Fandinho, pesquisadores do **INIFiocruz** e CRPHF- ENSP respectivamente e Marcia Aparecida da Silva Pereira, aluna do programa de Pós Graduação Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica-INI, solicitamos o "Parecer de Dispensa de análise ética da presente pesquisa intitulada ***"Detecção rápida da tuberculose multidrogarresistente por método Molecular.***

A pesquisa envolverá culturas do *Mycobacterium tuberculosis* estocadas no banco de cepas do laboratório de bacteriologia da tuberculose do Centro de Referência Professor Helio Fraga (CRPF/ENSP/FIOCRUZ). As mesmas, após seleção aleatório serão submetidas à técnica de inativação e extração de DNA para posteriormente os isolados serem submetidas as técnica de biologia molecular MAS-PCR e seqüenciamento de DNA.

Informamos ainda que a pesquisa é de caráter retrospectivo, não haverá nenhuma associação dos casos de TB com as culturas investigados e o resultado do estudo não afetara nas decisões terapêuticas.

Termo de confiabilidade (TC), termo de compromisso e responsabilidade (TCR) na utilização do banco de cepas e termo de confidencialidade com a pesquisa, estão disponíveis na plataforma Brasil e poderão ser encaminhados a Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia (CEP-INI) para avaliação caso seja necessário.

Além disso, a pesquisa não envolve seres humanos. Por esses motivos solicitamos o **parecer de dispensa ética** a essa conceituada comissão.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Sandra Wagner Cardoso', is positioned above a solid horizontal line.

Sandra Wagner Cardoso

Pesquisadora Responsável

ANEXOS

10.1 Tabela geral do estudo

Amostragem		TSA		Sequenciamento								Múltiplos Alelos Específicos					
		RIF	INH	codon Mut.RpoB				KatG		INHA		RpoB			KatG	INHA	
N	Amost	RIF	INH	531	526	516	Amino Acido	315	Amino acido	mab-InhA-15	inhA-15	531	526	516	315	InhA -15	
1	836/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	Mut.	C-T	531	WT	WT	Mut.	Mut.
2	543/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
3	314/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
4	837/03	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-AspAAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
5	501/03	TB mono INH	S	R	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
6	1740/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	WT	Não detectado	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
7	2355/02	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-ArgCGC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
8	2688/02	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-ValGTC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	516	Mut.	WT
9	491/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACA	WT	ND	WT	WT	516	Mut.	WT
10	247/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	Mut.	C-T	WT	WT	516	Mut.	Mut.
11	2056/02	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-AspGAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
12	270/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
13	2689/02	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-AspGAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
14	96/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-ValGTC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	516	Mut.	WT
15	232/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-TrpTGG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
16	640/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	516	Mut.	Mut.
17	826/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
18	2678/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	WT	Não detectado	WT	ND	531	WT	WT	WT	WT
19	1205/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	WT	SerAGC-ThrACC	Mut.	C-T	531	WT	WT	WT	Mut.
20	2448/02	TB sensível	S	S	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
21	2505/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACA	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
22	2788/02	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	516	Mut.	WT

23	1411/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
24	884/03	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-TyrTAC	WT	Não detectado	WT	ND	WT	526	WT	WT	WT
25	009/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-TrpTGG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
26	2010/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	Mut.	C-T	531	WT	WT	WT	Mut.
27	MG 294	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
28	243/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-TrpTGG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
29	2791/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
30	265/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	Mut.	C-T	531	WT	WT	Mut.	Mut.
31	1316/96	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	WT	Não detectado	Mut.	C-T	531	WT	WT	WT	Mut.
32	886/03	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
33	2668/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
34	2417/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
35	792/03	TB mono INH	S	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-ASnAAC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
36	78/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	Mut.	C-T	531	WT	WT	Mut.	Mut.
37	2697/02	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
38	2153/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
39	865/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
40	2316/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
41	441/03	TB sensível	S	S	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
42	379/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-TrpTGG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
43	981/96	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
44	263/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
45	433/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	WT	Não detectado	WT	ND	531	WT	WT	WT	WT
46	563/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
47	039/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-ValGTC	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	516	Mut.	WT
48	869/03	TB sensível	S	S	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
49	1576/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
50	PA 107	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
51	1085/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	Mut.	C-T	WT	WT	516	Mut.	Mut.
52	1314/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT

53	GO 150	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-AspGAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
54	1221/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
55	976/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
56	PE 76	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
57	BA 378	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-AspGAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
58	MG 231	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-AspGAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
59	BA 358	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-CysTGC	Mut.	SerAGC-AsnAAC	Mut.	C-T	WT	526	WT	Mut.	Mut.
60	AM 452	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
61	1126/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
62	2319/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-AsnAAC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
63	2410/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	HisCAC-CysTGC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
64	2625/02	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
65	1010/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
66	1251/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
67	885/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-AsnAAC	Mut.	C-T	WT	WT	WT	Mut.	WT
68	1221/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
69	637/03	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-TyrTAC	WT	Não detectado	WT	ND	WT	526	WT	WT	WT
70	2475/02	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
71	2010/97	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
72	89/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-TrpTGG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
73	2197/02	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
74	229/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	WT	Não detectado	WT	ND	531	WT	WT	WT	WT
75	32/03	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-AspGAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
76	605/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	WT	Não detectado	WT	ND	531	WT	WT	WT	WT
77	CE 02	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
78	1264/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
79	BA 297	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	516	Mut.	WT
80	MG 285	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
81	262/03	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
82	RS 261	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-AspGAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT

83	PE 07	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ILeATC	Mut.	C-T	531	WT	WT	Mut.	Mut.
84	RS 88	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	WT	Não detectado	WT	ND	531	WT	WT	WT	WT
85	2205/02	TB sensível	S	S	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
86	CE 155	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
87	1269/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
88	529/03	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
89	PE O3	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	516	Mut.	WT
90	2525	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
91	711/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
92	156/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACA	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
93	738/03	TB sensível	S	S	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
94	2414/02	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	516	WT	WT
95	319/02	TB sensível	S	S	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
96	847/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	516	Mut.	WT
97	310/03	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
98	PE 11	TB sensível	S	S	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
99	1194/03	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-AspGAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
100	235/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-TrpTGG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
101	1275/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-AsnAAC	WT	ND	WT	WT	516	Mut.	WT
102	720/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	SerTCG-TrpTGG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	516	Mut.	WT
103	682/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
104	790/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	WT	ND	WT	WT	WT	WT	Mut.
105	7011	TB mono INH	S	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
106	24	TB mono INH	S	R	WT	WT	WT	Não detectado	WT	Não detectado	Mut.	C-T	WT	WT	WT	WT	Mut.
107	850/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	Mut.	C-T	WT	WT	516	Mut.	Mut.
108	276/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
109	415/03	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-AspGAC	WT	Não detectado	WT	ND	WT	526	WT	WT	WT
110	933/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
111	111 RJ	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	WT	WT
112	480/03	TB-MDR	R	R	WT	526	WT	HisCAC-AsnAAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT

113	5794	TB mono INH	S	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
114	599/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	516	Mut.	WT
115	2516/03	TB mono INH	S	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
116	2355/02	TB-MDR	R	R	WT	WT	526	HisCAC-ArgCGC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	526	WT	Mut.	WT
117	272/03	TB-MDR	R	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
118	405/05	TB mono INH	S	R	WT	WT	WT	Não detectado	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	WT	Mut.	WT
119	1828/02	TB-MDR	R	R	WT	WT	516	AspGAC-TyrTAC	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	WT	WT	516	Mut.	WT
120	274/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
121	94 RJ	TB-MDR	R	R	569/531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT
122	105/03	TB-MDR	R	R	531	WT	WT	SerTCG-LeuTTG	Mut.	SerAGC-ThrACC	WT	ND	531	WT	WT	Mut.	WT

10.2 Tabela geral do estudo

Amostragem		MAS-PCR vs TSA		MAS-PCR VS Seq	TSA vs Seq
N	Amostra		Concord	Concord	Concord
1	836/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
2	543/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
3	314/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
4	837/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
5	501/03	TB mono INH	Discordante	Concordante	Discordante
6	1740/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
7	2355/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
8	2688/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
9	491/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
10	247/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
11	2056/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
12	270/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
13	2689/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
14	96/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
15	232/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
16	640/03	TB-MDR	Concordante	Disconcordante *	Concordante
17	826/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
18	2678/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
19	1205/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
20	2448/02	TB sensível	Concordante	Concordante	Concordante
21	2505/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
22	2788/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
23	1411/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
24	884/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
25	009/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante

26	2010/02	TB-MDR	Concordante	Discordante	Concordante
27	MG 294	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
28	243/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
29	2791/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
30	265/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
31	1316/96	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
32	886/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
33	2668/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
34	2417/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
35	792/03	TB mono INH	Concordante	Concordante	Concordante
36	78/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
37	2697/02	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
38	2153/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
39	865/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
40	2316/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
41	441/03	TB sensível	Concordante	Concordante	Concordante
42	379/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
43	981/96	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
44	263/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
45	433/03	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
46	563/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
47	039/03	TB-MDR	Discordante	Discordante	Discordante
48	869/03	TB sensível	Concordante	Concordante	Concordante
49	1576/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
50	PA 107	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
51	1085/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
52	1314/03	TB-MDR	Discordante	Discordante	Discordante
53	GO 150	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
54	1221/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
55	976/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante

56	PE 76	TB-MDR	Discordante	Discordante	Concordante
57	BA 378	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
58	MG 231	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
59	BA 358	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
60	AM 452	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
61	1126/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
62	2319/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
63	2410/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
64	2625/02	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
65	1010/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
66	1251/03	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
67	885/03	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
68	1221/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
69	637/03	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
70	2475/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
71	2010/97	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
72	89/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
73	2197/02	TB-MDR	Discordante	Discordante	Concordante
74	229/03	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
75	32/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
76	605/03	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
77	CE 02	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
78	1264/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
79	BA 297	TB-MDR	Concordante	Discordante ?	Concordante
80	MG 285	TB-MDR	Discordante	Discordante	Discordante
81	262/03	TB-MDR	Discordante	Discordante	Discordante
82	RS 261	TB-MDR	Discordante	Discordante	Concordante
83	PE 07	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
84	RS 88	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
85	2205/02	TB sensível	Concordante	Concordante	Concordante

86	CE 155	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
87	1269/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
88	529/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
89	PE O3	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
90	2525	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
91	711//03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
92	156/03	TB-MDR	Concordante	concordante	Concordante
93	738/03	TB sensível	Concordante	Concordante	Concordante
94	2414/02	TB-MDR	Discordante	Discordante	Concordante
95	319/02	TB sensível	Concordante	Concordante	Concordante
96	847/O3	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
97	310/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
98	PE 11	TB sensível	Concordante	Concordante	Concordante
99	1194/03	TB-MDR	Discordante	Discordante	Concordante
100	235/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
101	1275/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
102	720/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
103	682/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
104	790/03	TB-MDR	Discordante	Discordante	Discordante
105	7011	TB mono INH	Concordante	Concordante	Concordante
106	24	TB mono INH	Concordante	Concordante	Concordante
107	850/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
108	276/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
109	415/03	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
110	933/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
111	111 RJ	TB-MDR	Discordante	Discordante	Concordante
112	480/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
113	5794	TB mono INH	Concordante	Concordante	Concordante
114	599/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
115	2516/03	TB mono INH	Concordante	Concordante	Concordante

116	2355/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
117	272/03	TB-MDR	Discordante	Concordante	Discordante
118	405/05	TB mono INH	Concordante	Concordante	Concordante
119	1828/02	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
120	274/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
121	94 RJ	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante
122	105/03	TB-MDR	Concordante	Concordante	Concordante