

Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública

SUELI LEMES DE ÁVILA ALVES

**ANÁLISE DAS BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA À ISONIAZIDA
E RIFAMPICINA DE ISOLADOS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
OBTIDOS DE PACIENTES COM TUBERCULOSE NO ESTADO DE GOIÁS.**

Orientador: Prof. Dr. André Kipnis

Dissertação de Mestrado

**Goiânia -GO
2010**

Ministério da Educação

Universidade Federal de Goiás

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública

SUELI LEMES DE ÁVILA ALVES

**ANÁLISE DAS BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA À ISONIAZIDA
E RIFAMPICINA DE ISOLADOS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
OBTIDOS DE PACIENTES COM TUBERCULOSE NO ESTADO DE GOIÁS.**

Orientador: Prof. Dr. André Kipnis

**Dissertação apresentada ao
PPGMT/IPTSP/UFG como requisito parcial
para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina Tropical, área de
concentração de Microbiologia.**

Goiânia-GO
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

Alves, Sueli Lemes de Ávila.

Estudo de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à isoniazida e rifampicina. Sueli Lemes de Ávila Alves 2010.

ix, 80 f.: il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. André Kipnis

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. TBMDR; 2. Rifampicina; 3. Isonizida; 4 Genes *katG* e *rpoB*. I. Análise das bases moleculares da resistência à isoniazida e rifampicina de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos de pacientes com tuberculose no estado de Goiás

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos,
como exemplo de luta, perseverança e força de vontade.

**Deve-se sempre seguir em frente
Ainda que as pernas estejam trêmulas.**

Robin Robers

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** por ter me dado fé para acreditar que seria capaz, forças para resistir diante das dificuldades, e esperanças para seguir em frente.

Ao meu amor, amigo e companheiro **Reinaldo Porto**, por confiar em mim, estar ao meu lado nos momentos difíceis e incentivar-me a não desistir.

Ao meu orientador, **Dr. André Kipnis** por se disponibilizar a me orientar, mesmo sabendo das dificuldades que eu lhe causaria em função dos vários anos afastada da academia, da pouca disponibilidade de tempo e da quase ausência de conhecimento na área de Biologia Molecular.

À **Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis** pela colaboração nas correções da dissertação.

Aos colegas da Seção de Microbiologia/Micologia/ do LACEN-GO e em especial aos colegas do Setor de Micobactérias, **Ivanísio Gomes de Santana, Héberson Alves de Oliveira e Maria Gasparina de Carvalho** pela amizade e apoio na recuperação dos isolados utilizados neste estudo.

À responsável pelo setor de Ensino e Pesquisa/Lacen-GO, **MSc Myriam de Almeida** por incentivar me a buscar novos conhecimentos.

Aos colegas da VISA/DPCISS/SMS em especial à **MSc Zilah Cândida Pereira das Neves** por compreender que o tempo gasto com a educação retorna ao serviço como trabalho de melhor qualidade.

À coordenadora **Dra Ana Lúcia S. Andrade** e demais colegas do projeto Vigipneumo (Vigilância Epidemiológica Multinacional Latino para a Doença Pneumocócica Invasiva), pelo carinho e amizade a mim dispensados neste período que estivemos juntos.

Ao **Dr. João Alves de Araújo Filho** pela disponibilidade em cooperar com meu estudo e aos demais componentes da minha banca de qualificação, **Dr. Paulo Sucasas** e **Dr. Luiz Arthur** pelas preciosas sugestões.

Aos colegas do laboratório de **Bacteriologia Molecular** pelo acolhimento, amizade e colaboração.

A todos os **professores e funcionários** do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública que de uma forma ou outra contribuíram para este estudo.

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| QUADRO 1. Esquemas de tratamento para tuberculose utilizados no Brasil de 1979 a 2009. | 14 |
| QUADRO 2. Esquema básico para adultos e adolescentes utilizado a partir de 2009. | 15 |
| QUADRO 3. Esquema para multirresistência. | 15 |
| QUADRO 4. Mecanismos de ação e genes envolvidos com a resistência à H e R em <i>M. tuberculosis</i> . | 19 |
| QUADRO 5. Causas potenciais de resistência a drogas em <i>M. tuberculosis</i> . | 22 |
| QUADRO 6. Critérios de resistência do <i>M. tuberculosis</i> em meio de LJ com drogas. | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA I. Características dos pacientes portadores de TBMDR e com monorresistência a uma das duas drogas (H ou R). | 44 |
| TABELA II. Status para HIV, outras comorbidades e desfecho da doença nos pacientes portadores de TBMDR e monorresistentes. | 46 |
| TABELA III. Correlação do motivo de retratamento com tipo de tuberculose e esquemas utilizados para tratamento no momento da coleta da amostra clínica. | 47 |
| TABELA IV. Correlação dos esquemas de tratamento utilizados no momento da coleta da amostra clínica e tipo de TB. | 49 |
| TABELA V. Correlação da data da coleta, amostras clínicas, resistência fenotípica à H e R e mutações observadas nos genes <i>katG</i> e <i>rpoB</i> de isolados de <i>M.tuberculosis</i> . | 52 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. Organização do gene <i>rpoB</i> ressaltando as regiões e códons com mutações já descritas pela literatura. | 17 |
| FIGURA 2. Esquema ilustrativo do TS pelo método das proporções. | 37 |
| FIGURA 3. Eletroferograma ilustrativo do sequenciamento do gene <i>rpoB</i> . | 50 |
| FIGURA 4. Sequência do gene <i>katG</i> . | 53 |
| FIGURA 5. Sequência do gene <i>katG</i> . | 54 |
| FIGURA 6. Sequência do gene <i>rpoB</i> . | 55 |
| FIGURA 7. Sequência do gene <i>rpoB</i> . | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Adenina
Asn - Asparagina
Arg - Arginina
AIDS - Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
ATCC - American Typical Clinical Collection
BAAR - Bacilos Álcool Ácido Resistente
BCG - Bacilo Calmette Guerin
C - Citosina
CNCT - Centro Nacional de Controle da Tuberculose
CMTB - Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamino
DFC - Dose Fixa Combinada
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dNTPs - desoxirribonucleotídeo trifosfato
DOTS - Directly Observed Treatment Strategy
DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EA - Esquema Alternativo
E. coli - *Escherichia coli*
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
E I - Esquema I
E IR - Esquema IR
E III - Esquema III
E - Etambutol
Et - Etionamida
G - Guanina
G - Aceleração da gravidade
GC - Guanina-Citosina
Gly - Glicina
His - Histidina
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
H37Rv - Cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis*
H - Isoniazida
IS - Sequencia de inserção
Kb - Kilobases
L - Levofloxacina
LAM - Latino Americana Mediterrâneo
LPS - Longa Sequência de Polimorfismo
LCR - Líquido Céfal Raquidiano
LJ - Löwenstein-Jensen
M - Molar
MB - Milhões de Bases
MDR - Multidroga Resistente
MIRU - Mycobacterial Interpersal Repetitive Units
MNT - Micobactérias Não Tuberculosas

MOTT - Mycobacterium Other Than Tuberculosis
Ng - Nanogramas
P - Ácido Para-aminosalicílico
Pb - Pares de Bases
PCR - Reação da polimerase em cadeia
PNB - Ácido p-nitrobenzóico
PNCT - Programa Nacional de Controle da Tuberculose
Pro - Prolina
PQT - Poliquimioterapia
R - Rifampicina
RD - Região Diferenciadora
RNA - Ácido Ribonucleico
RFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
rpm - rotações por minuto
rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico
RRDR - Região de Determinação da Resistência à Rifampicina
S - Streptomina
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
Ser - serina
T - Timina
TB - Tuberculose
TBE - Tris-Borato-EDTA
TBMDR - Tuberculose multidrogas resistente
TBXDR - Tuberculose extensivamente drogas resistente
TCH - Hidrazida do ácido tiofeno 2 carboxílico
TE - Tris – EDTA
Thr - Treonina
tRNA - RNA transportador
TS - Teste de Suscetibilidade
Tyr - Tirosina
VNTR – Repetições em tandem de números variáveis
Z - Pirazinamida

RESUMO

A tuberculose multidroga resistente representa um desafio em escala mundial. O diagnóstico rápido através de técnicas moleculares é capaz de proporcionar uma terapêutica inicial mais agressiva e adequada. Este trabalho teve como objetivo analisar as bases moleculares da resistência à isoniazida (H) e rifampicina (R) de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de casos de tuberculose em Goiás e determinar geneticamente as causas destas resistências. Do total de 4.607 culturas para micobactérias realizadas no período de setembro 2005 a dezembro de 2007, foram analisados 24 isolados de 16 pacientes resistentes a H e/ou R. Os resultados obtidos dos testes fenotípicos de sensibilidade aos antimicrobianos foram comparados às mutações observadas nos principais genes responsáveis pelo desenvolvimento de resistência a estas drogas, gene *rpoB* para isolados resistentes à R e gene *katG* para os isolados resistentes à H. Dentre os 24 isolados, 71% eram fenotípicamente resistentes a H e as únicas mutações envolvidas com resistência foram observadas no códon 315 (41%). Dos isolados resistentes a R (71%), foram observadas mutações nos códons 456 (76,5%), 451 (17,6%) e 447 (5,9%). Nossos achados estão em concordância com as principais mutações observadas nos isolados resistentes a R e/ou H descritos na literatura. O percentual de concordância entre os testes fenotípicos e genotípicos foi de 41% para H e 94% para R considerando o número de isolados e de 40% e 91% respectivamente considerando-se o número de pacientes.

Palavras Chaves: TBMDR, Rifampicina, Isoniazida, genes *katG* e *rpoB*.

SUMMARY

Multidrug-resistant tuberculosis is a challenge worldwide. Rapid diagnosis by molecular techniques can provide a more aggressive and appropriate initial therapy. This study aimed to analyze the molecular basis of resistance to isoniazid (INH) and rifampin (R) of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from cases of human tuberculosis in Goiás and to genetically determine the causes of the observed resistances. Of the 4.607 cultures for mycobacteria processed in the period of September of 2005 and December of 2007, 24 isolates from 16 patients resistant to at least H and/or R were analyzed. We compared the results obtained by phenotypic tests with mutations in key genes responsible for the development of resistance to these drugs, the *rpoB* gene for isolates resistant to R and *katG* gene for strains resistant to H. Seventy one percent of the isolates were resistant to H, and the mutations involved with resistance observed in the *katG* gene were in codon 315 (41%). The most frequent mutations observed in the *rpoB* gene of the R resistant isolates (71%) were in codons 456 (76.5%) and 451 (17.6%). Our findings are similar to those reported in the literature. We conclude that the percentage of agreement between genotypic and phenotypic tests was 41% for H and 94% for R considering the number of isolates and 40% and 91%, respectively considering the number of patients.

Keywords: MDR-TB, Rifampicin, Isoniazid, *katG* and *rpoB* genes.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE QUADROS. | i |
| LISTA DE TABELAS. | ii |
| LISTA DE FIGURAS | iii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS. | iv |
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Histórico | 1 |
| 1.2. Características das micobactérias | 4 |
| 1.3. Patogenia | 6 |
| 1.4. Epidemiologia | 9 |
| 1.5. Tratamento | 10 |
| 1.5.1 Rifampicina | 16 |
| 1.5.2 Isoniazida | 18 |
| 1.6. Resistência aos agentes antimicobacterianos | 19 |
| 1.6.1 Resistência primária | 21 |
| 1.6.2 Resistência adquirida | 21 |
| 1.6.3 Tuberculose multidroga resistente | 21 |
| 1.6.4 Tuberculose extensivamente droga resistente | 24 |
| 1.7. Epidemiologia molecular | 25 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 30 |
| 3. OBJETIVOS | 33 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.1 | Objetivo geral | 33 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 33 |
| 4. | MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 4.1 | Amostragem | 34 |
| 4.2 | Coleta e processamento das amostras | 35 |
| 4.2.1 | Culturas | 35 |
| 4.2.2 | Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos | 35 |
| 4.2.3 | Extração do DNA cromossomal | 37 |
| 4.2.4 | Reação em Cadeia da Polimerase | 39 |
| 4.3 | Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR | 40 |
| 4.3.1 | Purificação | 40 |
| 4.3.2 | Sequenciamento dos produtos de PCR | 40 |
| 5. | RESULTADOS | 42 |
| 6. | DISCUSSÃO | 57 |
| 7. | CONCLUSÕES | 64 |
| 8. | PERSPECTIVAS | 65 |
| 9. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |
| 10. | ANEXOS | 75 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

A tuberculose (TB) é uma doença crônica que existe desde os tempos de Hipócrates, denominada também de tísica, palavra de origem grega que significa definhar. Conhecida também como Peste Branca e intitulada por John Bunyan na metade do século XVII como “Capitã da Morte Humana” (Ducati et al. 2006). A observação do nível de conservação dos genes de *Mycobacterium tuberculosis*, a pobreza de mutações e dados de análise de deleção do genoma levam à hipótese de que os modernos organismos de *M. tuberculosis* provêm de uma evolução de 15.000 a 20.000 anos (Mathema et al. 2006, Sreevatsan et al. 1997, Brosch et al. 2002).

A doença é causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e sua apresentação clínica é caracterizada principalmente pelo comprometimento dos pulmões (forma pulmonar) podendo atingir também outros sítios anatômicos (extrapulmonar) ou ocorrer de maneira disseminada que é denominada de tuberculose miliar (Ducati et al. 2006, Pandolfi et al. 2007).

Embora o microrganismo possa se instalar em qualquer órgão ou tecido do corpo humano, a forma pulmonar é a única com importância epidemiológica, por ser responsável pela manutenção da cadeia de transmissão (Silva & Boechat 2004).

Atualmente, ainda permanece como um sério problema de saúde pública em todo o mundo, com altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente

em países em desenvolvimento. Acomete preferencialmente pessoas na faixa etária mais produtiva da vida, compreendida entre 15 e 49 anos (van Soolingen 2001).

A doença ativa se desenvolve a partir de uma infecção primária ou por reativação endógena de uma infecção antiga podendo ocorrer também re-infecção exógena (Warren et al. 2004).

Nos últimos anos, além do aumento no número de casos nos países pobres de recursos, também re-emergiu em nações desenvolvidas, como consequência do aumento na imigração, sinergismo com a epidemia do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e falta de priorização dos programas de controle em saúde pública (Lazzarini et al. 2007).

Apesar de já existirem recursos tecnológicos capazes de promover seu controle, ainda não há perspectiva de obter-se, em futuro próximo, sua erradicação, a não ser que novas vacinas ou tratamentos sejam descobertos. Além disso, a associação da tuberculose com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) representa um novo desafio em escala mundial (Boffo et al. 2004).

Após o desenvolvimento de quimioterápicos específicos para a tuberculose, acreditou-se que a doença seria erradicada, contudo, houve redução nos investimentos em pesquisas e programas de controle, além de outros fatores como o advento da SIDA/AIDS, movimentos populacionais e o surgimento de linhagens multidroga resistentes, fazendo com que a doença atingisse proporções alarmantes e hoje consiste em umas das principais causas de mortes por doença infecciosa por um único agente no mundo

(Raviglione et al. 1995). Na tentativa de conter o problema a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem lançado estratégias como DOTS (Directly Observed Treatment Strategy), DOTS Plus e STOP TB que têm por objetivo padronizar ações e promover parcerias que contribuam para o fortalecimento dos profissionais e sistemas de saúde além de permitir que países em desenvolvimento com altas taxas da doença tenham acesso aos medicamentos de boa qualidade, com baixo custo, inclusive para a tuberculose multidroga resistente/TBMDR (Johnson et al. 2006, Fu & Shinnick 2007, Amukoye 2008).

A Organização Mundial de Saúde, através da estratégia STOP TB e baseado nas Metas de Desenvolvimento do Milênio, espera reduzir à metade a incidência e a mortalidade por TB até 2015, em relação ao ano de 1990 e, como meta de longo prazo, eliminar a doença como problema de saúde pública até o ano 2050. Para isso foram propostas metas mais rigorosas para avaliação do impacto da estratégia DOTS que é composta de cinco elementos para o controle da TB: a) compromisso político, b) detecção de casos por baciloscopia c) tratamentos diretamente observados com esquemas padronizados d) sistema regular e ininterrupto de suprimento de drogas e) sistema de registro de notificações (Dye et al. 2005, Johnson et al. 2006).

A tipagem molecular, baseada em marcadores genéticos, permite a rápida detecção e identificação de micobactérias em nível de espécie dentro do complexo *M. tuberculosis* (CMTB), bem como fornece ferramentas úteis para analisar a transmissão e a evolução destes microrganismos. Através de análises do genoma está sendo possível organizar a estrutura da população mundial de *M. tuberculosis* (Lazzarini et al. 2008). Os avanços na área de diagnóstico

laboratorial permitiram a realização de teste de suscetibilidade a drogas de segunda linha, caracterização e tipagem molecular de membros do complexo *M. tuberculosis* atualmente utilizadas na maioria dos laboratórios de micobactérias. Nos últimos anos tem sido desenvolvidas uma grande variedade de ferramentas para a tipagem genética molecular destes isolados (Diguimbaye et al. 2006).

1.2 CARACTERÍSTICAS DAS MICOBACTÉRIAS

As micobactérias estão posicionadas taxonomicamente na Ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, Gênero *Mycobacterium* que compreende as espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), responsáveis pela doença em humanos e animais e *Mycobacterium Other Than Tuberculosis* (MOTT), atualmente designadas como Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) que contam com mais de 125 espécies descritas (Brosch et al. 2002). Pertencem ao CMTB as espécies *M. tuberculosis*, (principal responsável pela tuberculose em humanos), *M. bovis* (responsável pela doença em bovinos e humanos) e *M. africanum* responsável pela tuberculose em humanos, encontrada no leste e oeste da África (Koneman et al. 2001; Brosch et al. 2002). Alguns autores citam também *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* como pertencentes ao CMTB. A espécie *M. Canetti* citada por alguns autores como pertencente ao complexo (Arnold 2006), foi descrita inicialmente por Canetti em 1969 e de acordo com Euzéby ainda não foi oficialmente reconhecida como membro do CMTB (Euzéby, 2009). Segundo Brosch (2002), *M. canetti* é uma variante lisa de *M. tuberculosis*, muito rara, geralmente isolada de pacientes

africanos ou que tenham contato com esta região. Embora apresente sequência 16S rRNA idêntica a outros membros do complexo difere em muitos aspectos incluindo polimorfismo genético, número de cópias de IS1081, morfologia da colônia e conteúdo lipídico da parede celular.

De acordo com a edição de 1986 do *Bergey's Manual* as cepas clássicas do CMTB podem ser diferenciadas fenotipicamente das demais espécies do complexo, porém, vários parâmetros como análise de extratos antigênicos e estudos de homologia antigênica indicam que todas as espécies do complexo representam uma única espécie (Wayn & Kubica 1986). Geneticamente, todos os membros deste complexo são extremamente similares apresentando 99,9% de identidade do rRNA 16S (Chimara et al. 2004). Embora os estudos evidenciem que os membros deste complexo constituam de fato uma única espécie, por razões ligadas à importância médica e veterinária do grupo, tais como poder patogênico e espectro de hospedeiros de cada espécie, a nomenclatura permanece (Niero & Leão 2004).

São bactérias aeróbias, imóveis, não esporuladas, não encapsuladas, em forma de bastonetes curvos ou retos, medem de 1 a 10 μm de comprimento por 0,2 a 0,6 μm de largura. Possuem alto conteúdo lipídico na sua parede celular (cerca de 60% do seu peso seco) constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, denominados de ácidos micólicos que lhes confere a propriedade morfotintorial da álcool-ácido resistência que é a característica mais importante deste gênero. Devido à capacidade de resistir à descoloração pelo álcool e ácido são designados de bacilos álcool-ácido resistentes, ou BAAR (Jawetz et al. 2000; Adekambi & Drancourt 2004).

O *M. tuberculosis*, principal espécie do gênero, tem tempo de geração de 18 horas em meio de Löweinstein-Jensen (LJ), ou seja, requer mais de sete dias para produzir colônias visíveis em meios de cultura sólidos como LJ que é composto por glicerol e asparagina como principais fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente (Pandolfi et al. 2007). Em meio de LJ desenvolvem-se como colônias não pigmentadas que ao microscópio óptico e coloração de Ziehl-Neelsen apresentam-se na forma de ramos alongados e tortuosos conhecidos como cordas. A presença de cordas na baciloscopia é indicativa de virulência, ou seja, CMTB (Hunter et al. 2006).

1.3 PATOGENIA

Em 1722, Benjamin Marten levantou a hipótese de que a doença era transmitida de um indivíduo a outro, através da tosse de uma pessoa doente e inalação por outra pessoa saudável. Em 1865 Jean-Antoine Villemin demonstrou formalmente através de experimentos com coelhos que a tuberculose era uma doença contagiosa. Em 1882, Robert Koch isolou e cultivou o *M. tuberculosis* extraído de tubérculos triturados (Ducati et al. 2006).

A patogenicidade do *M. tuberculosis* depende de sua capacidade de sobreviver e crescer dentro das células do hospedeiro. O bacilo não produz toxinas demonstráveis, porém, quando envolvido pelos macrófagos, inibe a fusão das vesículas fagocíticas com os lisossomos (Pandolfi et al. 2007).

A tuberculose é uma doença que afeta principalmente os pulmões e tem início com uma reação inflamatória inespecífica progredindo para uma reação granulomatosa que limita a disseminação dos bacilos. Na maioria dos casos de infecção primária estas lesões evoluem favoravelmente embora alguns bacilos possam persistir viáveis nos tecidos por meses ou décadas. Uma vez que a resposta imune não consegue erradicar definitivamente o patógeno, é estabelecida uma infecção crônica com um complexo mecanismo de regulação da resposta imunológica decorrente da interação entre hospedeiro e patógeno, nesta situação (Botasso et al. 2007).

O sistema imune é capaz de conter a evolução de infecção para doença em 90% dos indivíduos. Apenas dez por cento (10%) dos indivíduos vão desenvolver tuberculose ativa após um período de latência que pode variar de semanas a muitas décadas e de um modo geral com várias apresentações clínicas variando de subclínica a potencialmente fatal, podendo envolver qualquer órgão (Pandolfi et al. 2007). A patogenicidade exata do bacilo e os fatores que determinam a grande variabilidade no curso da infecção permanecem apenas parcialmente esclarecidos (Dormans et al. 2004), porém, acredita-se que os bacilos possam permanecer vivos no interior dos granulomas durante toda a vida do indivíduo reativando-se diante de condições favoráveis ao seu desenvolvimento sendo que o risco de desenvolver a doença é maior nos dois primeiros anos após a infecção (Pandolfi et al. 2007). O indivíduo portador pode sofrer uma redução de sua capacidade em responder à infecção sob algumas condições como por exemplo o uso de corticóides e outras drogas imunossupressoras, o desenvolvimento de certas doenças como diabetes

mellitus e a infecção pelo vírus HIV favorecendo o desenvolvimento de doença ativa (American Thoracic Society, 2000). Indivíduos com infecção latente, ou seja, que não apresentam a doença em sua forma ativa, não transmitem os bacilos (Pandolfi et al. 2007).

TB recorrente é a nova ocorrência da doença após um prévio episódio que tenha sido considerado clinicamente curado. Em geral a tuberculose ativa pode ocorrer devido a uma infecção recente ou reativação endógena de uma infecção prévia (Mathema et al. 2006).

A progressão de infecção para doença ou cura é regulada pela integridade do sistema imunológico através do qual pode ocorrer a eliminação imediata do microrganismo e/ou a condição de latência ou falência destes mecanismos e desenvolvimento de doença ativa (Ducati et al. 2006).

Existem acentuadas diferenças na capacidade das várias espécies de micobactérias de causar lesões em hospedeiros diferentes. Tanto o *M. bovis* como o *M. tuberculosis* são igualmente patogênicos para os humanos e a via de infecção (respiratória versus intestinal por exemplo), vai determinar o padrão das lesões e sintomatologia (Jawetz et al. 2000).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que 1/3 da população mundial esteja infectada com o bacilo da tuberculose resultando em dois milhões de mortes anualmente e oito milhões de casos novos por ano (Anthony et al. 2005).

A OMS alerta que se a efetividade dos programas de controle da doença não obtiver melhoras substanciais, o número de casos passará de 200 milhões em 2001 para perto de 1 (um) bilhão em 2020 (Kanduma et al. 2003).

Dois dos grandes problemas no controle da doença são a co-infecção com o vírus HIV e a resistência às drogas usadas atualmente para o tratamento (van Soolingen et al. 2001).

De acordo com o décimo terceiro relato anual da OMS sobre tuberculose, em 2007 havia no mundo todo, 9,27 milhões de casos de tuberculose com uma taxa de incidência de 139/100.000 habitantes (Donald & van Helden 2009). O Brasil apresenta o maior número de casos da América Latina, com taxa de incidência de 48 novos casos/100.000 habitantes e taxa de prevalência de 60/100.000 obtendo nos últimos anos uma melhoria no ranking dos 22 países prioritários em programas de controle da OMS passando do 16º lugar em 2006 para o 18º em 2007 (OMS 2008).

Segundo informações do Ministério da Saúde, no Brasil, 70% dos casos estão concentrados em 315 dos 5.565 municípios existentes no país.

Na distribuição de casos por unidade federada, os estados do Rio de Janeiro e Amazonas possuem as maiores taxas de incidência com 71,7/100.000 habitantes e 66,9/100.000 habitantes, respectivamente.

Pernambuco, Pará, Rio Grande do Sul, Bahia, Ceará, Acre, Alagoas e Maranhão possuem taxas de incidência superiores a 38,2 casos por 100.000 habitantes. Goiás (8,6), Distrito Federal (12,0) e Tocantins (15,5) são os estados com os menores valores de incidência no país (Brasil 2009)¹. Considerando-se por regiões a que apresenta maior incidência é a Norte com 48,2/100.000 habitantes, seguida pelo Sudeste, com 45,5/100.000, o Nordeste, com 43,1/100.000, o Sul, com 30,4/100.000, e por último, o Centro-Oeste, com 27,9/100.000 (Brasil 2009)¹.

De acordo com estudo de Brito e colaboradores (2004), no estado do Rio de Janeiro a maior notificação é feita pela capital, município do Rio de Janeiro sendo que 30% dos casos diagnosticados têm origem em hospitais (Brito et al. 2004).

1.5 TRATAMENTO

As drogas usadas no tratamento da tuberculose destroem as micobactérias patogênicas, mas paradoxalmente, podem selecionar os microrganismos resistentes para os quais as drogas tornam-se ineficientes (Johnson et al. 2006). Antes da descoberta de antibióticos específicos para o tratamento da tuberculose, a doença não tinha cura e a mortalidade era de 50 a 60%. Naquela época o tratamento era realizado em unidades hospitalares, denominadas de sanatórios e constituía-se de repouso, ar fresco, banhos de sol e dieta saudável (Ducati et al. 2006). Com a introdução de drogas específicas, na década de 50 e desenvolvimento de novas drogas acompanhadas da

implantação de regimes específicos na década de 80, a chance de cura passou a ser de 98%, acreditando-se a partir daí em uma possível erradicação da doença (Brasil 2002).

Logo após a introdução das primeiras drogas para o tratamento da tuberculose, (estreptomicina, ácido para-aminosalicílico e isoniazida), foram observadas resistências clínicas nos isolados de *M. tuberculosis* (Crofton & Mitchison 1948, Siddiqi et al. 2007). Estudos sobre resistência às drogas em vários países na década de 1960 demonstraram que os países em desenvolvimento apresentavam maior incidência de resistência a drogas do que países desenvolvidos (Espinal 2003). A resistência aos tuberculostáticos é conhecida desde a descoberta da primeira droga anti-TB, a estreptomicina, em 1944, e a presença de mutantes resistentes em populações selvagens têm sido bastante documentadas. A vigilância da resistência primária (quando o paciente já se infecta com um microrganismo resistente) e adquirida (quando a resistência surge após o início do tratamento) é importante para o conhecimento da qualidade dos programas, da quimioterapia empregada e detecção de erros nos respectivos tratamentos anteriores (Bostanadab et al. 2007).

Estudos *in vitro* mostraram que no *M. tuberculosis* a mutação espontânea, (que ocorre independente do contato prévio com a droga), é a principal causa do desenvolvimento da resistência, enquanto que a pressão seletiva aos antimicrobianos pode estar à frente do aumento acentuado de mutantes resistentes às drogas (Mathema et al. 2006). Mutantes resistentes a qualquer droga estão presentes naturalmente em qualquer grande população bacteriana, independente de exposição prévia a drogas (Johnsons et al. 2006, Paramasivan

& Venkataraman 2004). A cronicidade da doença e longo tempo necessário para seu tratamento com antibióticos leva ao aparecimento de bacilos resistentes a drogas. A utilização de pelo menos três drogas no tratamento da tuberculose minimiza o risco de desenvolvimento destas cepas resistentes, e garante o sucesso da cura.

O tratamento inconsistente ou parcial da doença favorece o surgimento de cepas multirresistentes. As mutações que conferem resistência são processos espontâneos cujas frequências ocorrem na taxa de 1×10^8 . Em estudos epidemiológicos observa-se uma proporção entre bacilos resistentes e sensíveis da ordem de 1×10^6 para isoniazida e 1×10^8 para rifampicina e menos do que 1×10^{14} para ambas simultaneamente (Sharma et al. 2006, Siddiqi et al. 2007).

A terapia combinada com várias drogas é essencial para diminuir a incidência de resistência durante o tratamento. A seleção de mutantes resistentes pode ocorrer quando os pacientes são tratados inadequadamente ou são expostos, mesmo que transitoriamente a doses sub-terapêuticas levando à pressão seletiva para emergência e manutenção de microrganismos resistentes (Mathema et al. 2006). Nos casos de TBMDR o tratamento é realizado com drogas denominadas de “segunda linha” que são mais caras, mais tóxicas e menos eficazes que as de primeira linha. O tempo mínimo de tratamento para TBMDR é de 18 meses e deve ser feito sob monitoramento e supervisão. Os pacientes devem receber aconselhamento no sentido de que o desenvolvimento de resistência a estas drogas esgota as possibilidades de tratamento (Raviglione et al. 2007, Chan et al. 2004).

No Brasil, a estreptomicina era usada como a única droga no tratamento da tuberculose até a descoberta do ácido para-aminosalicílico em 1946 quando o tratamento passou a ser a associação das duas drogas para evitar a emergência da resistência observada nos esquemas monoterápicos. Em 1952, a isoniazida passou a fazer parte da politerapia, porque, naquele ano foi descoberta a sua eficácia contra o bacilo da tuberculose (Hijjar et al. 2007). No final da década de cinquenta, Fraga e colaboradores realizaram estudo no Laboratório Central de Tuberculose do Rio de Janeiro demonstrando alta frequência de resistência a pelo menos duas das drogas usadas nos pacientes com tuberculose. Esta situação levou o CNCT (Centro Nacional de Controle da Tuberculose), em 1964, a padronizar os esquemas de tratamento, isto é, seleção dos medicamentos, tempo de uso e dosagens de acordo com o histórico clínico/quimioterápico dos pacientes (Hijjar et al. 2007, Brasil 2002).

Em 1979 ocorreu nova modificação do esquema quimioterápico passando a ser composto pela R, H e pirazinamida (Z), com duração de seis meses (esquema 2RHZ/4RH) para os pacientes sem tratamento anterior. O esquema de seis meses usado atualmente e mostrado no Quadro 1 é eficaz e menos tóxico. O Ministério da Saúde está propondo uma mudança de tratamento com a introdução do etambutol como quarto fármaco na fase intensiva do tratamento (dois primeiros meses) do esquema básico (Quadro 2).

A introdução do etambutol é justificada pelos aumentos da resistência primária à isoniazida de 4,4% para 6,0% e resistência primária à isoniazida associada à rifampicina de 1,1 para 1,4%, observados nos dados preliminares do

II Inquérito Nacional de resistência aos fármacos anti TB do qual participaram 6 estados (BA, MG, SP, SC, RS, RJ) além do Distrito Federal, conduzido em 2007 e 2008, em comparação com os resultados do I Inquérito Nacional, realizado no período de 1995 a 1997 (Brasil 2009)². Estas três drogas mais o etambutol (E) são consideradas drogas de 1ª linha, as quais são usadas no tratamento da TB e capazes de produzir uma atividade esterilizante em tratamento de curto prazo (Johnson et al. 2006).

Quadro 1. Esquemas de tratamento para TB utilizados no Brasil de 1979 a 2009.

| Situação | Tempo/Tratamento |
|---|---------------------|
| Sem tratamento anterior: Esquema I | 2 R H Z / 4 R H |
| Com tratamento anterior: Esq. IR Recidivante ou retorno após abandono: | 2 R H Z E / 4 R H E |
| Meningite Tuberculosa: Esquema II | 2 R H Z / 7R H |
| Falência dos Esquemas I ou IR: Esquema III | 3 S Et E Z / 9 Et E |

Fonte: Brasil 2004.

Siglas adotadas pela OMS: (R) rifampicina; (H) isoniazida; (Z) pirazinamida; (E) etambutol; (S) estreptomicina; (Et) etionamida.

Assim, em 2010 deverá ser lançada no Brasil a nova apresentação do fármaco, DFC (dose fixa combinada) também conhecido como “quatro em um” para ser utilizado na fase intensiva do tratamento. A vantagem dessa terapia é que ela aumenta a efetividade e a eficácia do tratamento com a inclusão de uma quarta droga em um mesmo comprimido, o que reduz o abandono e melhora a adesão ao tratamento além da queda no valor do tratamento por paciente de US\$ 40 para US\$ 30. Cada comprimido do novo esquema de

tratamento contém rifampicina 150mg, isoniazida 75mg, pirazinamida 400mg e etambutol 275mg. O novo esquema terapêutico será usado nos dois primeiros meses dos novos tratamentos e o restante da terapia, que dura mais quatro meses, será feita com as drogas usadas atualmente (Quadro 2). Dessa forma, continuarão em uso duas das quatro drogas em um mesmo comprimido, conhecido como “dois em um”. Portanto, tanto os pacientes novos quanto os antigos cumprirão o mesmo esquema terapêutico nos últimos quatro meses de tratamento. Foi proposto também o esquema de tratamento padronizado para casos de TBMDR, conforme quadro 3 (Brasil 2009)².

Quadro 2. Esquema Básico (EB - 2RHZE/4RH) para adultos e adolescentes, utilizado a partir de 2009.

| Regime | Fármacos/Concentração | Duração |
|----------------------------|--|---------|
| 1 RHZE Fase intensiva | RHZE -150/75/400/275 mg Comprimido em DFC | 2 meses |
| 4 RH Fase de manutenção | RH – 300/200 ou 150/100mg Cápsula ou comprimido | 4 meses |

Fonte: Brasil 2009². Siglas: DFC (Dose fixa combinada); R (rifampicina); H (isoniazida); Z (pirazinamida); E (etambutol).

Quadro 3. Esquema para multirresistência (EMR – 2S5ELZT/4S3ELZT/12ELT).

| Regime | Fármaco | Duração |
|---------------------------------------|---|----------|
| 2S5ELZT Fase intensiva 1ª etapa | Estreptomicina, etambutol, levofloxacina, pirazinamida, terizidona. | 2 meses |
| 4S3ELZT Fase intensiva 2ª etapa | Estreptomicina, etambutol, levofloxacina, pirazinamida, terizidona. | 4 meses |
| 12 ELT Fase de manutenção. | Etambutol, levofloxacina, terizidona. | 12 meses |

Fonte: Brasil 2009².

Siglas: S (estreptomicina); E (etambutol); L (levofloxacina); Z (pirazinamida); T (terizidona).

A detecção precoce da resistência a drogas em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* é imprescindível não apenas para o tratamento adequado, como também para prevenir a disseminação de microrganismos resistentes (Amukoye 2008).

1.5.1 Rifampicina

A rifampicina é um fármaco lipofílico, altamente ativo contra micobactérias que foi introduzido para tratamento da tuberculose em 1970 (Cunha e Frota 2005). Pode ser considerada como um marcador para a multirresistência aos fármacos porque raramente observa-se monorresistência a ela o que sugere que a mesma leve à rápida seleção de mutantes resistentes a outras drogas do esquema de curta duração (Campos 1999, Miotto et al. 2006). A resistência à R tem sido atribuída a mudanças estruturais da RNA polimerase, produto da expressão do gene *rpoB* o que leva a ligação pouco eficiente do fármaco ao seu alvo (Carvalho et al. 2007, Rosseti et al. 2002).

Estudos de sequenciamento de DNA têm demonstrado que mais de 95% dos isolados resistentes à R apresentam mutação na região de 81 pb, entre as bases 1276 e 1356 (códon 432 a 458 no gene *rpoB* de *M. tuberculosis* correspondentes aos códon 507 a 534 no gene *rpoB* de *Escherichia coli*), da subunidade β da RNA polimerase. Esta região denominada de RRDR (Região de Determinação de Resistência à Rifampicina) é sabidamente a região determinante para a resistência à R e usada como ponto alvo para métodos de

sondas e sequenciamento (Rigouts et al. 2007, Bostanadab et al. 2007). Como já foram descritas também mutações fora desta região (como por exemplo, nos códon 176, 486, 496 e 497, 558 e 598 (Figura 1), é recomendado que, quando os estudos genéticos da região I visando à detecção da resistência à R falharem, o gene *rpoB* deve ser sequenciado inteiro para prevenir demoras desnecessárias no diagnóstico da TBMDR (Heep et al. 2001, Jenkins et al. 2005).

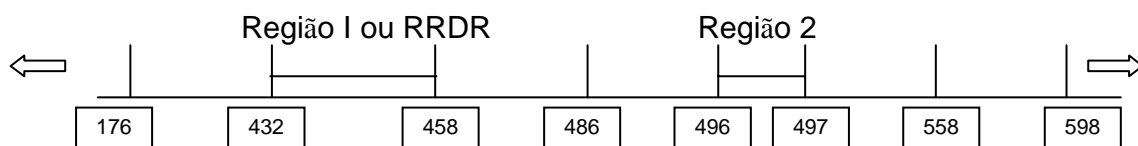


Figura 1. Organização do gene *rpoB* ressaltando as regiões e códon com mutações já descritas pela literatura.

É importante determinar a distribuição das mutações que levam às resistências em cada país através da introdução de rotinas diagnósticas de testes moleculares a fim de controlar a disseminação da doença, incluindo a investigação apropriada de casos através de diagnósticos rápidos e início imediato da quimioterapia efetiva (Bostanadab et al. 2007).

Várias técnicas foram desenvolvidas para detectar a resistência à R como: teste de suscetibilidade, bioluminescência, citometria de fluxo e identificação molecular através de pesquisa de alterações no gene *rpoB*, responsável por esta resistência (Sachan et al. 2002).

1.5.2 Isoniazida.

A isoniazida é o mais antigo fármaco sintético efetivo contra a tuberculose e reconhecido desde 1952 como potente agente contra o *M. tuberculosis*. A droga tem uma estrutura química simples e modo de ação bastante complexo. A sua elevada potência pode ser justificada devido à droga possuir vários alvos dentro da célula micobacteriana. O fármaco entra na célula por difusão passiva e inicialmente não é tóxico para a célula micobacteriana porque funciona como uma pró-droga. Posteriormente é ativado pela enzima catalase peroxidase codificada pelo gene *katG* da micobactéria, passando então a inibir a biossíntese dos ácidos micólicos que compõem a parede celular, tornando a bactéria suscetível aos radicais de oxigênio e outros fatores do meio (Timmins et al. 2006, Cunha & Frota 2005, Ramaswamy et al. 2003).

Mutações no gene *katG* podem resultar na incapacidade de ativação da pró-droga resultando em resistência (Fu & Shinnick 2007). De acordo com Rinder e colaboradores (1999), a maioria das mutações no gene *katG* responsáveis por resistência a H ocorre no códon 315 deste gene. Vários estudos relataram que além do gene *katG* outras mutações que afetam os alvos da droga estão envolvidas com a resistência à H (Quadro 4). A proteína carreadora de *enoyl acyl redutase*, codificada pelo gene *inhA* e uma β *Ketoacyl sintase* (ACP) codificada pelo gene *kasA* são dois potenciais alvos de inibição da H. Estas duas enzimas estão envolvidas na biossíntese de ácidos micólicos. A enzima alkyl hidróxido peróxido redutase, codificada pelo gene *ahpC* também está envolvida com a

resistência à H. (Rosseti et al. 2002, Timmins et al. 2006, Cunha & Frota 2005, Ramaswamy et al. 2003).

Quadro 4. Mecanismos de ação e genes envolvidos com a resistência à H e R em *M. tuberculosis*.

| Drogas | Mecanismos de ação | Genes envolvidos com a resistência | Função | Frequência de mutações em <i>M. TB</i> resistentes. |
|--------|--|--|-------------------------|---|
| H | Inibição da biossíntese dos ácidos micólicos | <i>katG</i> - Catalase peroxidase | Conversão da pró-droga | 42 a 58% |
| | | <i>inhA</i> – enzima enoyl acp redutase | Alvo do fármaco | 21 a 34% |
| | | <i>kas A</i> - β ketoacyl ACP syntase | Alvo do fármaco | Não estabelecido |
| | | <i>ahpC</i> – alkyl hidroperóxido redutase | Marcador de resistência | 10 a 15 % |
| R | Inibição da transcrição | <i>rpoB</i> - subunidade β da RNA polimerase | Alvo do fármaco | 96 a 100% |

Adaptado de Rosseti et al. 2002.

1.6 RESISTÊNCIA AOS AGENTES ANTIMICOBACTERIANOS

Embora a cura para a doença tenha sido descoberta há anos, a epidemia global é crescente, concomitante com a co-infecção com o vírus HIV e aumento da prevalência de linhagens resistentes à R e H, as duas principais drogas utilizadas no tratamento da doença (Timmins et al. 2006).

Em *M. tuberculosis* são produzidas mutações espontâneas no cromossoma numa taxa de 1×10^8 células por geração que podem conferir resistência aos antimicrobianos em situações que levam a seleção de

microrganismos resistentes, como tratamento inadequado, não aderência ao tratamento, programas mal administrados, compra e distribuição de drogas inadequadas, não realização de testes de biodisponibilidade de drogas e descontinuação dos programas (Jain & Dixit 2008).

O teste de suscetibilidade (TS) é o exame laboratorial realizado para detectar o perfil de resistência/sensibilidade dos isolados de *M. tuberculosis*. Existe uma controvérsia sobre a utilização dos TS no manejo do tratamento individual de pacientes. Os países que dispõem de recursos financeiros recomendam a realização do TS para todos os pacientes no momento do diagnóstico. Nos países com escassez de recursos financeiros os TS são indicados apenas em ocasiões especiais (Brasil 2008). De acordo com a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, no II Consenso Brasileiro de Tuberculose o TS é indicado em situações de: a) retratamento após falência bacteriológica do esquema I, b) casos de recidiva da doença, c) reinício de tratamento após abandono, d) pacientes suspeitos de resistência primária, e) contatos de casos de tuberculose resistente, f) vigilância epidemiológica (Brasil 2004).

Os testes de suscetibilidade para drogas de 2ª linha são menos reprodutivos do que os utilizados para H e R e exigem melhores metodologias (Jain & Dixit 2008).

1.6.1 Resistência primária

Ocorre em pacientes que nunca tiveram a doença ou que foram curados com sucesso de uma tuberculose anterior mas se re-infectaram com um novo organismo resistente (Amukoye 2008, Bergval et al. 2009).

1.6.2 Resistência adquirida

Surge de organismos infecciosos inicialmente sensíveis às drogas, mas que adquirem resistência através de mutações durante o processo infeccioso de um indivíduo. Este fenômeno é fomentado por sistemas de saúde que prescrevem antimicrobianos inadequadamente, falta de adesão do paciente ao tratamento ou, em alguns casos, por razões desconhecidas (Bergval et al. 2009, Johnson et al. 2006).

1.6.3 Tuberculose Multidroga Resistente

De acordo com a OMS considera-se multirresistência quando uma linhagem apresenta resistência à no mínimo, H e R, as duas principais drogas em qualquer regime de tratamento (Di Pierre et al. 2004, Chan et al. 2004).

Como as mutações que causam resistência à H ocorrem numa proporção aproximada de 1×10^6 replicações da bactéria e as mutações que causam

resistência à R ocorrem em 1×10^8 replicações, a probabilidade de mutações espontâneas causarem resistência concomitantemente a H e R é de 1 em 10^{14} replicações. Considerando-se que esse número de bacilos não é encontrado com frequência mesmo em indivíduos com extensa tuberculose pulmonar cavitária, a chance de desenvolvimento de resistência espontânea à H e R é praticamente nula, podendo ser observado no Quadro 5 as causas potenciais da resistência (Sharma et al. 2006, Sachan et al. 2002).

Quadro 5. Causas potenciais de resistência a drogas em *M. tuberculosis*.

| | |
|--|---|
| Fatores relacionados a tratamentos prévios | Tratamento inadequado. Tratamento incompleto. |
| Manejo dos pacientes | Monoterapia. Esquema de tratamento inicial inadequado. Adição de uma única droga ao esquema de falência. Falhas na identificação precoce da resistência. |
| Outras causas | Não aderência ao tratamento. Profilaxia com H inadequada. Variações na biodisponibilidade da droga. |

Adaptado de OMS 2000.

Em contraste, ao que ocorre na maioria das bactérias com relação à resistência as drogas, em *M. tuberculosis* esta resistência não é resultante da transferência horizontal de genes (por elementos genéticos) mas como consequência da substituição de nucleotídeos, inserções ou deleções em determinadas regiões alvos específicas para aquisição de resistência ou seus promotores ou ativação de enzimas de agentes quimioterápicos anti-tuberculose, devido à pressão seletiva vantajosa que favorece o crescimento de fenótipos

resistentes os quais acabam predominando mesmo em pessoas infectadas com cepas que eram originariamente sensíveis às drogas (Post et al. 2004).

Os regimes atuais de tratamento para TBMDR são complexos, de alto custo, utilizados por longos períodos, associados a altas taxas de efeitos colaterais e baixa resposta, relacionados com alta morbidade e mortalidade (Araújo - Filho et al. 2008, Jain & Dixit 2008). Alguns estudos relatam que a taxa de falência às drogas de 2ª linha podem chegar a 27,8% restando como única opção a ressecção cirúrgica de um dos pulmões (pneumonectomia) ou mais comumente a lobectomia que é a ressecção de apenas um lobo (Kim et al. 2006). Um estudo realizado em Shangai - China, relata que a taxa de cura entre os casos de TBMDR primária foram maiores que as taxas de cura nos pacientes com TBMDR adquirida (Zhao et al. 2009).

Como a resistência às drogas em *M. tuberculosis* ocorre apenas no cromossoma os estudos de resistência às drogas através da biologia molecular, são considerados ideais para a investigação epidemiológica (Mathema et al. 2006).

Um recente estudo de meta-análise mostrou que em comunidades com altas taxas de resistência primária, o regime de tratamento iniciado apenas com abordagens baseadas na história de tratamento prévio do paciente pode aumentar a taxa de resistência a drogas (Zhao et al. 2009).

1.6.4 Tuberculose Extensivamente Droga Resistente.

TBXDR foi primeiramente definida em novembro de 2005 como resistências a H e R e mais 3 (três) das 6 (seis) classes de drogas de segunda linha usadas no tratamento da doença: aminoglicosídeos, polipeptídios, fluoroquinolonas, tioamidas, ciclosserina e ácido para-aminosalicílico (Jain & Dixit 2008). Em 2006 em uma força tarefa realizada em Genova estabeleceu-se um novo conceito, mais facilmente aplicável à realidade mundial devido às dificuldades dos laboratórios em realizar teste de suscetibilidade a todas as drogas de 2ª linha e definiu-se TBXDR como a tuberculose resistente à H e R e também a no mínimo uma fluoroquinolona (mofloxacina, ofloxacina, gatifloxacina, levofloxacina, sparfloxacina ou ciprofloxacina) e mais uma das 03 drogas injetáveis de segunda linha (capreomicina, kanamicina ou amicacina). Foi lançado também o termo TB Pré XDR que é a doença causada por organismos resistentes às duas principais drogas de primeira linha (H e R) e também a uma fluoroquinolona ou a uma das drogas injetáveis de segunda linha, mas não a ambas (Zhao et al. 2009).

Após a divulgação desta nova forma de resistência a droga (TBXDR) vários países retestaram suas cepas de TBMDR que estavam congeladas e constatou-se que várias cepas eram na realidade XDR. O percentual de TB XDR entre os pacientes TBMDR variou de 3% nos EUA a 19% em Latvia (Zhao et al. 2009).

Ambas as formas de resistência (MDR e XDR) são causadas pelo uso inadequado de drogas de 1ª e 2ª linha e falha no diagnóstico dos pacientes

aumentando a disseminação dos microrganismos resistentes (Amukoye 2008). Segundo Raviglione e colaboradores (2007), uma série de erros tem contribuído para o desenvolvimento da TBXDR e, para interromper este ciclo, as necessidades básicas são: a) infraestrutura para controle efetivo da doença começando por reforçar a capacidade laboratorial b) diagnóstico baseado na baciloscopia de escarro seguido de métodos rápidos de cultura em meios líquidos; c) suporte apropriado aos pacientes com tratamento supervisionado até a confirmação da cura. A detecção imediata através de TS é necessária para assegurar que os pacientes recebam o diagnóstico e o tratamento adequado precocemente interrompendo assim a transmissão da doença.

1.7 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A epidemiologia molecular utiliza conjuntamente as técnicas de biologia molecular que caracterizam o conteúdo de nucleotídeos dos microrganismos com a epidemiologia clássica que estuda a distribuição e os fatores determinantes da doença nas populações humanas (Pandolfi et al. 2007). Designa os vários métodos moleculares como arma para agrupar dados relevantes através da identificação de patógenos envolvidos em doenças transmissíveis, em nível de espécies, subespécies, organismos, clones e genes de interesse (Tibayrenc 2005).

É um campo que possibilita a integração da biologia molecular, medicina clínica, estatística e epidemiologia, ou seja, concentra-se no modelo da genética e fatores de risco ambientais, em níveis moleculares, celulares ou bioquímicos,

na etiologia e distribuição das doenças nas populações. Principalmente nas doenças infecciosas a epidemiologia molecular atenta para utilizar uma multidisciplinaridade aproximada para identificar fatores que determinam a causa da doença, propagação, disseminação e distribuição no tempo e espaço (Mathema et al. 2006).

Em 1998 foi publicada a sequência completa do genoma do *M. tuberculosis* através de uma cepa de referência, H37Rv (ATCC 27294) o que permitiu a identificação de características exclusivas deste patógeno que apresenta cromossoma circular com 4.411.529 pb (4,4 MB) com 65,6% de conteúdo G+C (Brasil 2002).

Uma das características que mais diferencia este microrganismo de outras bactérias é a presença de aproximadamente 4000 genes, a maioria codificando para enzimas envolvidas em lipólise e lipogênese. Este microrganismo tem aproximadamente 250 enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos. O genoma é rico em repetições de DNA, essencialmente sequência de inserção (IS), que são sequências repetidas de famílias conservadas de multigenes, insertos em intergenes ou regiões não codificadas, frequentemente fechadas para genes tRNA. Estes são geralmente agrupados, indicando a existência de regiões de alta frequência (do inglês "hotspots") de inserção (Ducati et al. 2006). A existência de elementos de repetição e o seu uso potencial para discriminar isolados de *M. tuberculosis* foi reconhecido por vários autores. A sequência do elemento de inserção IS 6110, foi primeiramente reportada por Thierry e colaboradores em 1990. Outros pesquisadores sequenciaram outros elementos de inserção como o IS 986 e o IS 987 de *M. bovis* BCG. Como as três

sequências diferiram apenas em poucos pares de base, elas podem ser consideradas essencialmente o mesmo elemento e para evitar confusão foi recomendada a designação de IS 6110 para esses elementos, exceto quando fosse de interesse uma cópia específica (van Embden et al.1993).

O genoma do *M. tuberculosis* apresentou-se homogêneo em todo o mundo. Parece que a maioria das recombinações ocorre através de transposons que são elementos instáveis com capacidade de causar muitos tipos de transposição, deleção, inversão e duplicação. Os transposons simples são sequência de inserção IS e aproximadamente 14 diferentes tipos de sequência de inserção foram identificados no genoma. Estas sequências de inserção conferem a variação no polimorfismo genético e são frequentemente usadas para a diferenciação entre espécies. A sequência de inserção IS 6110 está presente no CMTB com número de cópias variável (0 a 25 cópias) e está integrada a vários sítios cromossomais altamente polimórficos, mas bastante estáveis para investigações epidemiológicas (Moström et al. 2002).

Em estudos realizados anteriormente, todos os isolados de *M. tuberculosis* não relacionados epidemiologicamente mostraram um diferente padrão de bandas quando a IS 6110 foi usada como sonda. Geralmente são encontradas várias cópias de IS em *M. tuberculosis* enquanto que *M. bovis* BCG apresenta um baixo número de cópias (van Soolingen et al.1991).

A principal meta dos estudos epidemiológicos de base populacional para tuberculose baseado em técnicas moleculares é poder distinguir entre reativação da doença e transmissão recente (Murray & Alland 2002), o que pode ser melhor explicado através de estudos em que se assume que um indivíduo doente vai

transmitir a doença para um número de indivíduos contatados e que os padrões de DNA mudam ao longo do tempo através de mutações randômicas, pode se assim afirmar que padrões semelhantes de *fingerprints* provêm de infecção recente (contatantes) enquanto que aqueles não agrupados em clusters são assumidos como reativação da doença (infecção antiga). Deve ser observada também a idade do paciente uma vez que a doença entre os jovens é mais provável de ser atribuída à transmissão recente (Vynnycky et al. 2001).

Quando IS6110 é usado como sonda para DNA de *Mycobacterium tuberculosis*, digerido com endonuclease de restrição, cada microrganismo apresenta um único padrão de banda particular. Como regra geral dois organismos que apresentem algumas poucas cópias de IS 6110 não devem ter o mesmo padrão de bandas a não ser que estejam epidemiologicamente vinculados (Cave et al. 1994). Atualmente, RFLP- IS 6110 é o padrão de referência para tipagem de organismos de *M. tuberculosis* (Moström et al. 2002).

Os estudos de epidemiologia molecular de vários isolados de pacientes de coorte permitem uma refinada aproximação da classificação das falências de tratamento. Se um isolado inicial e os subsequentes têm o mesmo padrão genotípico, pode se concluir que a resistência foi adquirida. Por outro lado se o genótipo diferir, pode-se inferir que o paciente desenvolveu tuberculose como consequência de re-infecção exógena com um organismo de *M. tuberculosis* diferente, denominada de resistência primária. A correta diferenciação entre estes dois mecanismos de falência clínica é fundamental para a escolha do tratamento mais apropriado, assim como para orientação das medidas de prevenção da transmissão (Rosemberg et al. 2003).

Através de técnicas de biologia molecular foram descritas várias linhagens como, por exemplo, a cepa Beijing, que contribuiu para o ressurgimento da tuberculose em Nova York em 1990 a qual é altamente virulenta e está associada com surtos de TBMDR. Foram descritas também a família LAM (Latino Americana Mediterrâneo) que contribui com 15% da carga global da doença, embora pouco se conheça sobre a epidemiologia, comportamento biológico e atributos clínicos da doença causada por cepas da família LAM. Isolados de *M. tuberculosis* da família LAM foram inicialmente descritos como ramos de uma mesma árvore filogenética mas, posteriormente, devido à heterogeneidade genética desta família ficou evidente que haviam diferentes grupos LAM distribuídos em várias regiões geográficas (Dubiley et al. 2007). Os microrganismos foram agrupados de acordo com alterações como deleções, inversões, inserções, duplicações em regiões diferenciadoras denominadas de RD (Lazzarini et al. 2008). No Brasil sabe-se que o genótipo RD^{Rio} é um clone originário da família LAM pertencente ao grupo 9 (LAM 9) e caracteriza-se por uma longa sequência de polimorfismo (LPS), através de deleções observadas no genótipo RD^{Rio} (Lazzarini et al. 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Segundo informações do Ministério da Saúde, no Brasil, 70% dos casos de tuberculose estão concentrados em 315 dos 5.565 municípios existentes no país, e estes são considerados como municípios prioritários pelo Plano Nacional de Controle da Tuberculose do Brasil. No estado de Goiás os municípios prioritários são a capital, Goiânia, e o município de Aparecida de Goiânia.

O estado de Goiás, cuja capital é Goiânia, possui uma área de 341.289,5 Km² e população de 5.840.650 habitantes com densidade de 14,65 habitantes por Km². A região metropolitana de Goiânia possui 2.012.929 habitantes. O estado possui 242 municípios sendo que 44% (105 municípios) possuem programa de tuberculose implantado e realizam baciloscopias para diagnóstico e controle de tratamento de tuberculose.

No ano de 2009, no estado todo, a incidência da tuberculose de todas as formas foi de 13,9/100.000 habitantes (822 casos), e, 7,9/100.000 habitantes (467 casos) quando analisados apenas os pulmonares bacilíferos. Considerando-se as metas propostas pelo Ministério da Saúde, o PCT estadual atingiu em 2009, 95,0% de detecção de pulmonares-bacilíferos e 94,4% de todas as formas. A taxa de cura atingiu 76,8% e o percentual de abandono de tratamento caiu para 7,5%. Ambas as taxas não atingiram as metas propostas pelo PNCT que é de 85% de cura e abandono menor que 5%.

A cada ano que passa são relatados no mundo todo cada vez mais casos de tuberculose causados por organismos resistentes aos antimicrobianos. A emergência e disseminação destes bacilos resistentes têm alertado para a

necessidade de mais pesquisas sobre os mecanismos de resistência às drogas assim como de novas drogas efetivas contra a tuberculose (Ramaswamy et al. 2003).

A detecção de *M. tuberculosis* resistente é geralmente realizada por testes de suscetibilidade convencionais, os quais requerem o isolamento do microrganismo a partir do espécime clínico, seguido do cultivo dos isolados, na presença de diferentes drogas. O tempo transcorrido entre a coleta do material e o resultado do TS varia de 50 a 90 dias. As técnicas moleculares permitem a identificação e perfil de resistência do microrganismo em poucos dias.

Análises moleculares de bacilos resistentes sugerem que a resistência é adquirida por alterações no alvo do fármaco como consequência de mutações no gene que codifica esse alvo.

A resistência à H está associada a uma variedade de mutações que afetam vários genes como os que codificam para a catalase peroxidase (gene *katG*), enzima enoyl-ACP redutase (gene *inhA*), alkyl hidroperóxido redutase, envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo (*ahpC*) e a enzima-ketoacyl ACP syntase (gene *kasA*).

A rifampicina interage com a subunidade β da RNA polimerase e mutações em determinadas regiões do gene *rpoB* (que codifica para esta subunidade da polimerase) impedem a ligação eficiente do fármaco e consequentemente levam à resistência. A rápida detecção de microrganismos resistentes a esta droga é de grande importância na vigilância da TBMDR porque raramente observa-se resistência apenas a esta droga, motivo pelo qual a R é considerada como marcador de TBMDR (Bostanadab et al. 2007). As técnicas

moleculares podem ser muito úteis para verificar as mutações no gene *rpoB* responsável pela resistência à R e também para avaliação dos múltiplos *locus* envolvidos na resistência à H (Johnson et al. 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar as bases moleculares da resistência à H e/ou R de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de casos de tuberculose humana em Goiás.

3.2. Objetivos específicos

- Testar a sensibilidade de *M. tuberculosis* isolados de casos humanos em Goiás frente aos antimicobacterianos rifampicina e isoniazida.

- Amplificar os genes *rpoB* e *katG* por meio do emprego da técnica de PCR.

- Sequenciar as regiões gênicas de alta frequência de mutação dos genes *rpoB* e *katG*.

- Determinar as frequências de mutações observadas nos genes *rpoB* e *katG*.

- Comparar características fenotípicas e genotípicas destes isolados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAGEM

Foram analisados 24 isolados de *M. tuberculosis* oriundos de 16 pacientes no município de Goiânia, estado de Goiás, região Centro Oeste do Brasil, no período de 1º de setembro de 2005 a 31 de dezembro de 2007.

Os pacientes de todo o estado de Goiás que apresentaram recidiva da tuberculose ou falência de tratamento foram encaminhados ao hospital de referência para doenças infecto-contagiosas e TBMDR no estado de Goiás, Hospital de Doenças Tropicais (HDT/HAA), e os exames laboratoriais foram realizados pelo LACEN-GO, laboratório de referência no estado para análises de média e alta complexidade. Portanto, pode-se afirmar que a população estudada (resistentes a H e/ou R) reflete a grande maioria de casos de resistência a estas drogas no Estado de Goiás. Os isolados de *M. tuberculosis* foram obtidos de amostras clínicas (escarro, líquido céfalo-raquidiano e secreção de linfonodo), cultivadas em meio de Löweintein–Jensen (LJ), no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-GO).

Os isolados obtidos através de cultura em L.J foram identificados como pertencentes ao CMTB, através de crescimento em meio LJ acrescido de PNB e TCH e verificação da sensibilidade a estas drogas e análise complementar com a prova de niacina. Os isolados de *M. tuberculosis* foram identificados a partir da resistência ao TCH, sensibilidade ao PNB e produção de niacina. Realizou-se o teste de suscetibilidade a antimicrobianos para os isolados pertencentes ao

CMTB. Os tubos foram incubados por 28 a 42 dias em estufa $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e após as leituras e liberação dos resultados para os profissionais com especialidade em clínica médica os isolados foram congeladas em meio de Sauton com 10% de glicerol em freezer -20°C , conforme descrito no Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (Brasil 2008).

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

4.2.1 Culturas

As amostras de escarro foram descontaminadas pelo método de Petroff modificado (Brasil 2008), e semeadas em meio de Löwenstein Jensen. As amostras consideradas estéreis, como líquido, foram semeadas diretamente no meio de Löwentein Jensen sem nenhum tratamento prévio. Após a semeadura foram incubadas em estufa $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e observadas por um período de 30 a 60 dias (Brasil 2008).

4.2.2 Testes de suscetibilidade a antimicrobianos.

Os testes de suscetibilidade para drogas de primeira linha quantificam a proporção de mutantes resistentes a cada uma das drogas em um determinado isolado bacteriano. Esses métodos são muito precisos alcançando uma eficiência de 97% a 99% para determinar a atividade da isoniazida e rifampicina e de 92 %

para etambutol e estreptomicina (Brasil 2008). Os testes foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Canetti e colaboradores (1969). A metodologia consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes frente a uma concentração crítica da droga capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis, mas não o das resistentes (Aziz et al. 2003, Woods 2000).

Quadro 6. Critérios de resistência do *M. tuberculosis* em meio de LJ com drogas.

| Drogas | Concentração crítica ($\mu\text{g/mL}$) | Proporção crítica |
|----------------|---|-------------------|
| Isoniazida | 0,2 | 1% |
| Rifampicina | 40 | 1% |
| Etambutol | 2 | 1% |
| Estreptomicina | 4 | 1% |

Brasil 2008.

Os testes foram realizados a partir de cultura pura de *M. tuberculosis* em meio LJ, do qual foi preparada uma suspensão bacteriana em água destilada esterilizada ajustada para a concentração correspondente a escala 1 de McFarland. A partir desta suspensão, foram realizadas 5 diluições seriadas em escala decimal e utilizadas para a semeadura em meios de LJ as diluições 10^{-3} e 10^{-5} (Figura 2). Após a semeadura, os tubos foram incubados em estufa a 36°C e lidos após 28 dias (1ª leitura) e 42 dias (2ª leitura) para os casos que tenham sido sensíveis na primeira leitura, com o objetivo de assegurar o aparecimento tardio de colônias mutantes resistentes.

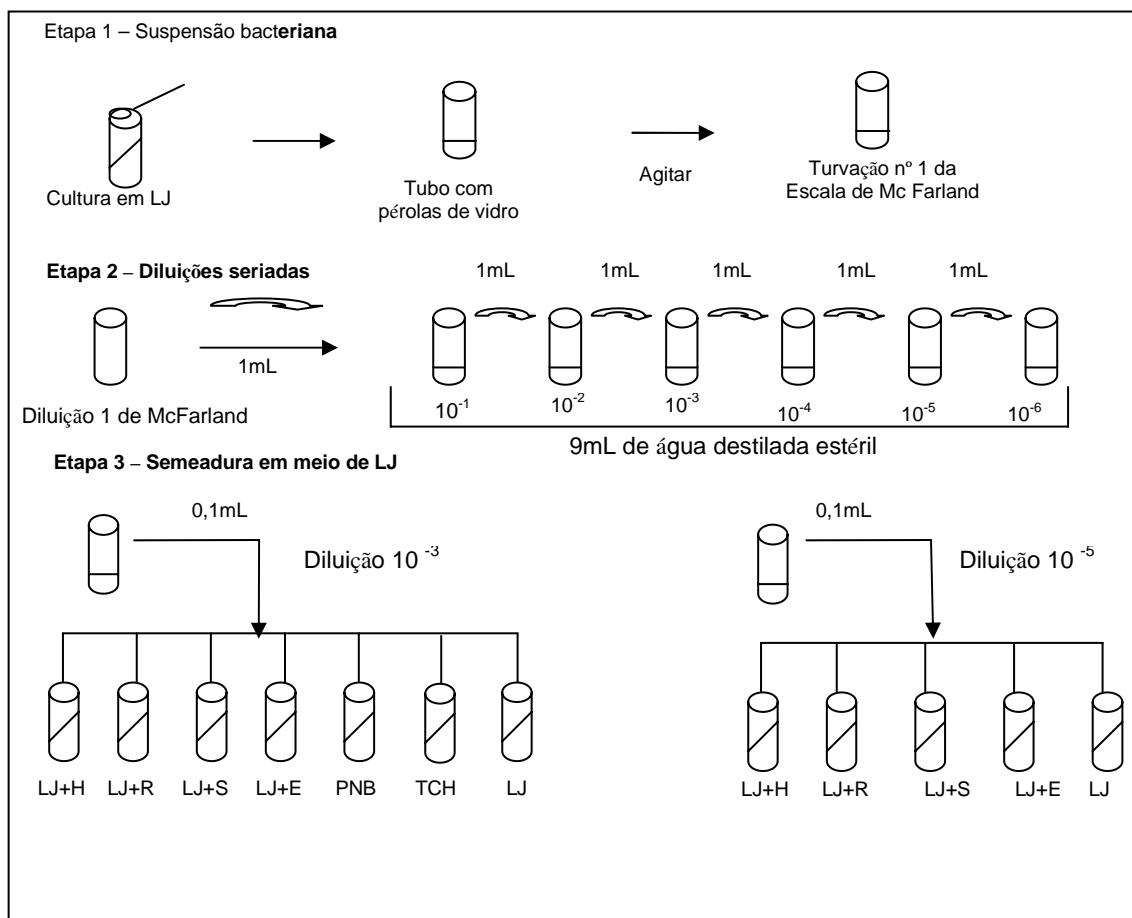


Figura 2: Esquema ilustrativo do TS pelo método das proporções segundo Canetti et al. 1969.

4.2.3 Extração de DNA cromossomal

Os isolados selecionados para participar deste estudo foram recuperados em meio de LJ e após o crescimento das colônias os tubos foram aquecidos a 80°C por 20 minutos para inativação das micobactérias por questões de biossegurança, ainda no LACEN-GO e então transportados para o Laboratório de Bacteriologia Molecular do Instituto de Patologia Tropical e Saúde

Pública da Universidade Federal de Goiás onde foram submetidos às técnicas moleculares.

Para extração do DNA cromossomal utilizou-se uma adaptação técnica descrita por van Soolingen e colaboradores (1994). O equivalente a duas alçadas de cada cultura foram ressuspendidas em 400 μ L de tampão TE por agitação. À suspensão foram adicionados 50 μ L de lisozima (20mg/mL) e incubados por 1 hora a 37°C. Ao sistema de digestão foram acrescentados 70 μ L de SDS a 10% e 12 μ L de proteinase K (20mg/mL) e o sistema foi incubado a 56°C por 10 minutos. Após incubação, 100 μ L de NaCl a 5M foram adicionados seguidos de 80 μ L de solução CTAB/NaCl (10%CTAB, 0,73M NaCl) e a solução foi agitada até se tornar leitosa e incubada por mais 10 minutos a 65°C.

Adicionou-se um volume 650 μ L de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1) seguido de agitação por 30 segundos e centrifugação por 5 minutos a 18.000g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e precipitado através da adição de 400 μ L de isopropanol gelado seguido de incubação a -20°C por 24 horas. O ácido nucléico foi coletado por centrifugação a 12.000g a 4°C por 20 minutos, lavado com 1 mL de etanol a 70%. Após secagem, o DNA foi ressuspendido em 50 μ L de água milliQ. Os DNAs extraídos foram armazenados em freezer -20°C.

4.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A partir dos DNAs cromossomais extraídos, dois microlitros de cada amostra diluída em água na proporção de 1:10 foram submetidos à reação de polimerase em cadeia (PCR).

O gene *rpoB* amplificado compreendeu a uma região de 332 nucleotídeos os quais foram amplificados pela PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: *rpoB1* (forward) 5'- GGGAGCGGATGACCACCC - 3' *rpoB2* (reverse) 5'- GCGGTACGACGGCGTTTCGATGAA C - 3' (Siddiqi et al. 2002).

O gene *katG* amplificado compreendeu a uma região de 209 nucleotídeos que foram amplificados pela PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: *katG1* (forward) 5'-GAAACAGCGGCGCTGATCGT -3' *katG2* (reverse) 5'- GTTGTCCCATTTCGTCGGGG -3' (Martilla et al. 1996).

A reação de PCR foi processada em um volume final de 30µL contendo além do DNA molde, 0,1 ηmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores para os genes *katG* ou *rpoB*, 0,2 µM dNTPs; e 1U da enzima Taq DNA polimerase (invitrogen). A reação de PCR foi realizada com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de incubação a 92°C por 40 segundos, incubação a 56°C por 40 segundos, e incubação a 37°C por 1 minuto, um último ciclo de 37° por 7 minutos para que a enzima completasse a polimerização das fitas. Cinco microlitros da reação de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. Como controle positivo da reação de PCR foi usado DNA

cromossomal da cepa padrão H37Rv de *M. tuberculosis* (Gentilmente cedida pelo Dr John Belisle, Colorado State University, EUA).

4.3 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

4.3.1 Purificação

Os DNAs foram purificados utilizando-se uma metodologia alternativa desenvolvida pelo Laboratório de Bacteriologia Molecular da UFG, (Silva et al. 2008) conforme descrito a seguir. O volume dos tubos que continham os DNAs amplificados por PCR foi aumentado para 300 µL com água, adicionou-se 180 µL de isopropanol e após homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, o material foi centrifugado a 12.000g por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol a 70% gelado. Os produtos de PCRs precipitados foram ressuspensos em 20 µL de água Milli Q.

4.3.2 Sequenciamento dos produtos de PCR

Após a purificação os produtos foram sequenciados utilizando-se um dos oligonucleotídeos usados como iniciadores para as reações de PCR, com kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) e a leitura das sequencias realizadas no aparelho ABI3130 (Applied Biosystems). Reações de sequenciamento com os oligonucleotídeos iniciadores forward e reverse foram analisados através do programa DNASTAR versão 5.1, (licenced to Fields Center for Diseases Control)

para a montagem dos “contigs”. As sequências consensus foram alinhadas em relação às sequências dos respectivos genes depositadas no Gene Bank (*rpoB* ncbi 888164, *katG* ncbi 885638) do microrganismo de referência H37Rv no programa clustalX (Larkin et al. 2007). As mutações observadas foram comparadas com as principais mutações descritas na literatura para os genes *katG* e *rpoB*.

5. RESULTADOS

No período de 1º setembro de 2005 a 31 de dezembro de 2007 foram realizadas quatro mil seiscentos e sete (4607) culturas para micobactérias no laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, LACEN-GO, referência para cultura de micobactérias no estado de Goiás. Destas, três mil oitocentos e cinquenta e nove (83,8%) resultaram negativas, quinhentos e trinta e três (11,6%) positivas para o gênero *Mycobacterium* e duzentos e quatorze (4,6%) apresentaram-se contaminadas. Dentre as positivas, quatrocentos e dez (77%) foram identificadas como *M. tuberculosis*, cento e dezenove (22,2%) como Micobactérias Não Tuberculosas, duas (0,4%) como *M. bovis* e duas (0,4%) ficaram inconclusivas em nível de espécie.

Dentre as 410 culturas positivas para *M. tuberculosis*, cento e vinte e quatro (30%) foram submetidas ao teste de suscetibilidade atendendo solicitação médica. Destas, foram selecionados vinte e quatro isolados (19%), recuperados de dezesseis pacientes que apresentaram resistência à pelo menos uma das duas principais drogas usadas no tratamento da tuberculose (H e/ou R). Dos 16 pacientes, 5 (31,2%) tiveram mais de um isolado analisado. A seleção dos isolados múltiplos foi baseada na positividade em diferentes espécimes clínicos e alteração nos perfis de resistência após introdução da terapia com antimicobacterianos.

Dos vinte e quatro isolados selecionados, vinte e um (87,5%) eram provenientes de escarro, dois (8,3%) de secreção de linfonodo pertencentes a um mesmo paciente e um (4,2%) de LCR. Foram realizadas 77 culturas dos 16

pacientes com média de 5 culturas por paciente sendo que o maior número de procedimentos por paciente foi 11 (14,3% do total) e o menor foi 1 (1,3%) de um único paciente.

A média de idade observada entre os pacientes incluídos no estudo foi de 43 anos: mínima 22 anos e a máxima de 63 anos.

Dos 16 pacientes, cinco (31,3%) eram do gênero feminino e onze (68,7%) do gênero masculino.

Na análise comparativa entre portadores de TBMDR e monorresistentes observa-se que nos dois grupos o sexo masculino foi o mais prevalente contribuindo com aproximadamente o dobro de casos em relação ao sexo feminino. A cor parda e baixo nível de escolaridade foram prevalentes nos dois grupos (MDR X monorresistentes à H ou R). Todos os isolados dos portadores de TBMDR com informações sobre o uso de tabaco declararam ser tabagistas ou ter abandonado o vício após o primeiro episódio de TB, diferente do grupo de monorresistentes em que o número de não fumantes foi o dobro do de fumantes. Dentre os portadores de HIV nenhum desenvolveu TBMDR (Tabela I).

Com relação ao desenvolvimento da doença, observamos que a evolução para óbito foi maior entre os portadores de TBMDR. Neste grupo de pacientes dois (20%) foram a óbito, dois (20%) permaneceram em tratamento até o final de 2009, dois (20%) abandonaram tratamento e quatro (40%) receberam alta por cura comprovada laboratorialmente. Entre os pacientes portadores de TB monorresistentes, cinco (83,3%) evoluíram para cura, um (16,7%) evoluiu para óbito, mas, por ser portador de HIV, não podemos afirmar que a TB tenha sido a causa do óbito.

Tabela I. Características dos pacientes portadores de TBMDR e monorresistência a uma das duas drogas (H ou R).

| Características ¹ | Pacientes MDR (%) ² | Número de Pacientes monorresistentes (%) ³ |
|------------------------------|--------------------------------|---|
| Gênero | n = 10 (100) | n = 6 (100) |
| Feminino | 3 (30) | 2 (33,3) |
| Masculino | 7 (70) | 4 (66,7) |
| Cor | n = 5 (100) | n = 5 (100) |
| Branca | 1 (20) | 2 (40) |
| Negra | 1 (20) | ----- |
| Parda | 3 (60) | 3 (60) |
| Escolaridade | n = 10 (100) | n = 6 (100) |
| 1º Grau Incomp. | 8 (80) | 3 (50) |
| 2º Grau Incomp. | 1 (10) | 2 (33,3) |
| 2º Grau Completo | 1 (10) | ----- |
| Superior | ----- | 1 (16,7) |
| Tabagismo | n = 8 (100) | n = 3 (100) |
| Sim | 8 (100) | 1 (33,3) |
| Não | ----- | 2 (66,7) |
| Etilismo | n = 6 (100) | n = 3 (100) |
| Sim | 3 (50) | 2 (66,7) |
| Não | 3 (50) | 1 (33,3) |
| Drogas ilícitas | n = 3 (100) | n = 1 (100) |
| Sim | 2 (66,6) | 1 (100) |
| Não | 1 (33,4) | ----- |
| Status para HIV | n = 9 (100) | n = 5 (100) |
| Positivo | 0 (00) | 2 (40) |
| Negativo | 8 (89) | 3 (60) |
| Não Realizado | 1 (11) | ----- |
| Evolução | n = 10 (100) | n = 5 (100) |
| Óbito | 2 (20) | 1 (20) |
| Cura | 3 (30) | 4 (80) |
| Em tratamento | 3 (30) | ----- |
| Abandono | 2 (20) | ----- |
| TB anteriores | n = 9 (100) | n = 5 (100) |
| Sim | 8 (89) | 2 (40) |
| Não | 1 (11) | 3 (60) |
| DOTS | n = 10 (100) | n = 6 (100) |
| Sim | 1 (10) | ----- |
| Não Informado | 9 (90) | 6 (100) |

1. Variáveis analisadas através de prontuários dos pacientes arrolados no estudo.

2. Número e percentual de pacientes portadores de TBMDR frente às variáveis analisadas.

3. Número absoluto e percentual de pacientes portadores de resistência a apenas uma das duas drogas analisadas (H ou R), frente às variáveis analisadas.

Dentre as comorbidades observadas no grupo dos MDR, dois (20%) apresentavam diabetes mellitus, dois (20%) eram usuários de drogas ilícitas, um (10%) era portador de hepatite C, quatro (40%) não apresentavam comorbidades associadas e de um (10%) não foi possível resgatar esta informação. No grupo dos monorresistentes apenas 1 (17%) não apresentava nenhuma comorbidade (Tabela II).

Dentre as causas de retratamento observadas entre os pacientes com TBMDR, um paciente (10%) era sabidamente por contato com TBMDR, apresentando, portanto resistência primária, quatro (40%) afirmaram ter completado tratamento e recebido alta por cura de suas tuberculoses iniciais retornando posteriormente ao serviço por recidiva da doença, quatro (40%) retornaram após o abandono do tratamento e de um (10%) não foi possível determinar a causa. Dentre os portadores de monorresistência, dois (33,3%) não eram portadores de TB anteriores, três (50%) eram recidivantes e um (16,7%) não foi possível recuperar esta informação (Tabela III).

Dos 10 pacientes portadores de TBMDR onze isolados com resistência à H e R (TBMDR) foram recuperados e feita a análise comparativa do tratamento utilizado no momento da coleta das amostras clínicas. Observou-se que cinco (45,4%) encontravam-se em tratamento com esquemas alternativos: (terizidona, claritromicina, amicacina, etionamida, etambutol, ofloxacina, rifabutina, clofazimina, entre outros); quatro (36,4%) encontravam-se em tratamento com o E III (3 S Et E Z / 9 Et E) no momento da coleta e dois ficaram sem informação por terem migrado para outras unidades de saúde.

Tabela II. Status para HIV, outras comorbidades e desfecho da doença nos pacientes portadores de TBMDR e monorresistentes.

| Nº ¹ | Status HIV ² | Outras comorbidades ³ | Ano da 1ª TB ⁴ | Desfecho ⁵ |
|-----------------|-------------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| 01 | Neg. | Não | 2002 | Lobectomia seguida de alta em 2008. |
| 02 | NI | DM | 2003 | Em tratamento até 2009. |
| 03 | Pos. | Histoplasmose Disseminada | 2007 | Alta por cura em 2008. |
| 04 | Neg. | Drogas ilícitas | 2001 | Alta por cura em 2009 |
| 05 | NI | NI | 2004 | Alta por cura em 2006. |
| 06 | Pos. | HBV + Retinite por citomegalovírus | 2006 | Óbito em 2008. |
| 07 | Neg. | Drogas ilícitas | NI | Abandono de tratamento. |
| 08 | Neg. | Não | 2001 | Óbito em 2008. |
| 09 | NI | DM + DPOC | 1995 | Alta por cura em 2007. |
| 10 | Neg. | Hepatite C | 2004 | Abandono de tratamento. |
| 11 | NI | Drogas ilícitas | NI | Alta por cura em 2007. |
| 12 | Neg. | Hanseníase | 2002 | Alta por cura em 2007. |
| 13 | Neg. | DM | 1997 | Em tratamento até 2009. |
| 14 | Neg. | Não | 2005 | Alta por cura em 2008. |
| 15 | Neg. | Não | 1998 | Óbito em 2007. |
| 16 | Neg. | Não | 2000 | Alta por cura em 2009. |

1. Número de identificação dos pacientes no estudo.

2. Status para HIV: pos - positivo, neg - negativo, NR - Não realizado, NI - Não informado.

3. Outras comorbidades: NI - Não informado, DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, DM – Diabetes mellitus.

4. Ano de manifestação do primeiro episódio de TB.

5. Desfecho da doença.

Tabela III. Correlação do motivo de retratamento com tipo de tuberculose e esquemas utilizados para tratamento no momento da coleta da amostra clínica.

| Nº ¹ | Status HIV ² | Retratamento ³ | Motivo ⁴ | Tipo de TB ⁵ |
|-----------------|-------------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|
| 1 | Neg. | Sim | Contato TBMDR | MDR |
| 2 | NI | Sim | Recidiva | MDR |
| 3 | Pos. | Não | Não | Resistente a H |
| 4 | Neg. | Sim | Recidiva | MDR |
| 5 | Neg. | NI | NI | Resistente a H |
| 6 | Pos. | Sim | Recidiva | Resistente a R |
| 7 | NR | Sim | Recidiva | MDR |
| 8 | Neg. | Sim | Abandono | MDR |
| 9 | Neg. | Sim | Recidiva | Resistente a H |
| 10 | Neg. | Sim | Abandono | MDR |
| 11 | Neg. | NI | NI | MDR |
| 12 | Neg. | Não | Não | Resistente a H |
| 13 | Neg. | Sim | Abandono | MDR |
| 14 | Neg. | Sim | Abandono | MDR |
| 15 | Neg. | Sim | Recidiva | MDR |
| 16 | NI | Sim | Recidiva | Resistente a H |

1. Numero de designação do paciente no estudo.

2. Status para HIV no momento do desenvolvimento da TB.

3. Se o caso é de retorno do paciente ao serviço.

4. Motivo do retorno. NI - Não informado

5. Tipo de TB no momento da coleta da amostra: MDR - Tuberculose multidrogas resistente, TS - Teste de Suscetibilidade, H - Isoniazida, R - Rifampicina.

Dos 6 pacientes portadores de TB monorresistentes, foram recuperados treze (13) isolados em diferentes momentos da doença sendo que quatro (31%), mesmo apresentando resistência a apenas uma das duas drogas (H ou R), encontravam-se em tratamento com esquema alternativo, dois (15,4%) utilizavam o esquema IR (2 R H Z E / 4 R H E) três (23%) utilizavam R + Z no momento da coleta da amostra, três (23%) utilizavam R + E + claritromicina e um (7,7%) não foi possível recuperar esta informação (Tabela IV).

Pela análise comparativa do percentual de concordância entre os testes fenotípicos e genotípicos pode-se afirmar que a resistência à isoniazida foi concordante em 41% dos isolados (7 de 17) e 40% dos pacientes (6 de 15). O

paciente de número 5 apresentou apenas uma mutação silenciosa no códon 297 e o paciente número 3 apresentou duas mutações, uma silenciosa no códon 297 e outra no códon 315 que confere resistência à H.

A análise genotípica confirmou a mutação no gene *rpoB* em dezesseis (94%) dos isolados (16 de 17) correspondente a 91% dos pacientes (10 de 11) com resistência fenotípica à R.

Pela análise comparativa entre os diversos isolados de um mesmo paciente pode observar-se que os isolados 13 A e 13 B apresentaram resistência fenotípica diferentes, ou seja, desenvolvimento de resistência fenotípica à R, oito meses após o início do tratamento com esquema IR, o que pôde ser observado após a coleta de nova amostra e realização de novo TS (Tabelas IV e V). Os padrões de resistência fenotípica foram confirmados através do sequenciamento (Figuras 3, 4 e 6). Pela análise de prontuário foi constatado que o referido paciente teve o primeiro caso de TB no ano de 1997 recebendo tratamento com o esquema I de medicamentos por apenas um mês. Ao retornar ao serviço por recidiva da doença foi introduzido o esquema IR (Tabela II).

Tabela IV. Correlação dos esquemas de tratamento utilizados no momento da coleta da amostra clínica e tipo de TB.

| Nº ¹ | Tratamento no momento da coleta ² | Tipo de TB ³ |
|-----------------|--|-------------------------|
| 1 | EA | MDR |
| 2 | E IR até o resultado do TS → E III | MDR |
| 3 | R + Z | Resistente à H |
| 4 A | E III | MDR |
| 4 B | E III | MDR |
| 4 C | EA | Resistente à R |
| 4 D | EA | Resistente à R |
| 5 | NI | Resistente à H |
| 6 A | R + E+ Claritromicina | Resistente à R |
| 6 B | R + E+ Claritromicina | Resistente à R |
| 6 C | R + E+ Claritromicina | Resistente à R |
| 7 | NI | MDR |
| 8 A | EA | MDR |
| 8 B | EA | Resistente à R |
| 9 | E IR | Resistente à H |
| 10 | EA | MDR |
| 11 | NI | MDR |
| 12 A | R + Z + PQT | Resistente à H |
| 12 B | R + Z + PQT | TS não realizado |
| 13 A | E IR | Resistente à H |
| 13 B | E III | MDR |
| 14 | EA | MDR |
| 15 | EA | MDR |
| 16 | EA | Resistente à H |

1. Número de designação do paciente no estudo. As letras referem-se às diferentes amostras de um mesmo paciente, coletadas em diferentes momentos, com diferentes esquemas de tratamento.

2. Tratamento utilizado no momento da coleta da amostra que foi selecionada para este estudo. EA - Esquema Alternativo, NI - Não Informado, E I - Esquema I, E IR - Esquema I Reforçado, E III - Esquema III, TS - Teste de Suscetibilidade, R - Rifampicina, Z - Pirazinamida, E - Etambutol, PQT - Poliquimioterapia.

3. Tipo de TB no momento da coleta da amostra: MDR - Tuberculose Multidrogas Resistente, TS - Teste de Suscetibilidade, H – Isoniazida, R - Rifampicina.

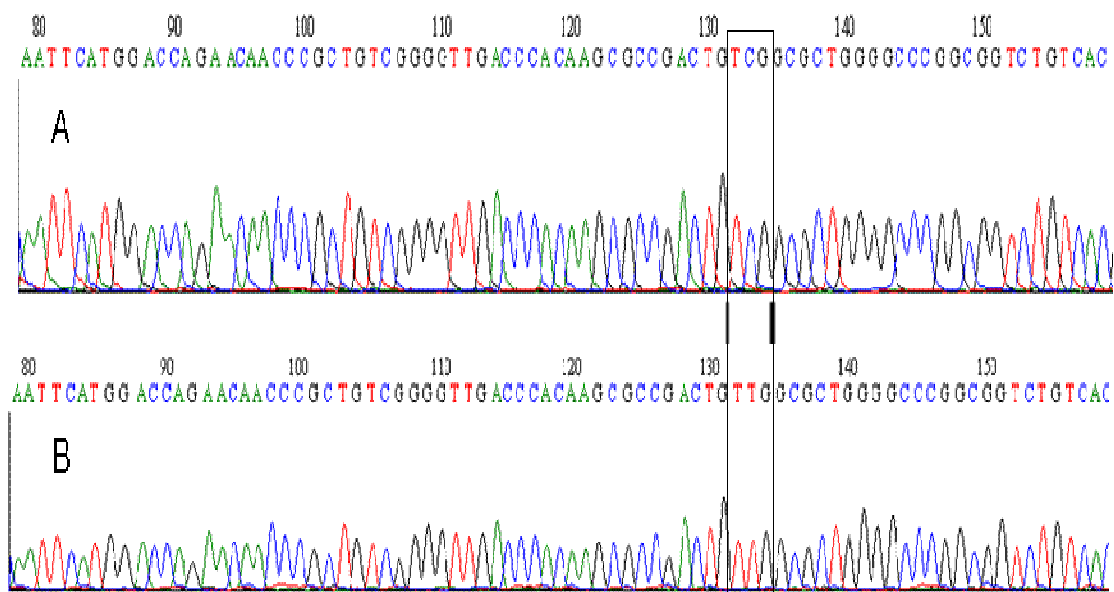


Figura 3: Eletroferograma ilustrativo do sequenciamento do gene *rpoB* de dois isolados: A – Sem mutação no códon 456 (ser TCG). B – Substituição no códon 456 (ser TCG → leu TTG).

O paciente 12 contribuiu com dois isolados e, destes, apenas no isolado recuperado de LCR (12 A) foi realizado TS por métodos fenotípicos. Pela análise de prontuários detectou-se que o referido paciente encontrava-se em tratamento com poliquimioterapia (PQT) para hanseníase quando foi diagnosticado como portador de meningite tuberculosa, através do isolamento de *M. tuberculosis* em amostra de LCR e classificado clinicamente como portador de TB miliar. O primeiro espécime enviado para cultura (LCR) foi positivo para TB com resistência fenotípica à H (Tabela V). A análise da sequência parcial do gene *katG* não revelou nenhuma mutação nesta região. Quarenta e sete dias depois foi coletada nova amostra (escarro), que também resultou em cultura positiva embora sem a realização do TS naquele momento. Extraiu-se o DNA para análises moleculares posteriores realizadas neste trabalho, porém, não foi possível reativar a cultura criopreservada para novos testes de suscetibilidade. O

sequenciamento do DNA extraído da cultura de escarro foi realizado evidenciando mutação no gene *rpoB*, que confere resistência à R conforme observado na Figura 6.

Os isolados dos pacientes 4 e 8 apresentaram padrões de resistência fenotípica compatíveis com populações mistas porque os TS apresentaram resultados diferentes passando de padrões resistentes para sensíveis o que é incompatível com uma única estirpe (Tabela V). A confirmação genotípica da resistência à H nestes isolados não foi possível em virtude dos isolados fenotipicamente resistentes à H não terem apresentado mutações no fragmento do gene *katG* sequenciado (Figuras 4 e 5).

Tabela V: Correlação da data da coleta, amostras clínicas, resistência fenotípica à H e R e mutações observadas nos genes *katG* e *rpoB* de isolados de *M. tuberculosis*.

| Nº ¹ | Data da coleta | Am ² | TS ³ | Sequência <i>katG</i> ⁴ | Sequência <i>rpoB</i> |
|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|--|---------------------------|
| 01 | 29/12/2006 | Esc | H e R | 315 ser (AGC) → thr (ACC) | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 02 | 02/01/2006 | Esc | H e R | 315 ser (AGC) → thr (ACC) | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 03 | 23/01/2007 | Esc | H | 315 ser (AGC) → thr (ACC) 297 gly (GGC) → gly (GGT) | NA |
| 4 A | 30/08/2005 | Esc | H e R | SM | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 4 B | 10/03/2006 | Esc | H e R | SM | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 4 C | 17/11/2006 | Esc | R | NA | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 4 D | 12/04/2007 | Esc | R | NA | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 5 | 02/04/2007 | Esc | H | 297gly (GGC) → gly (GGT) | NA |
| 6 A | 03/06/2007 | Linf | R | NA | 451 his (CAC) → tyr (TAC) |
| 6 B | 19/06/2007 | Linf | R | NA | 451 his (CAC) → tyr (TAC) |
| 6 C | 13/12/2007 | Esc | R | NA | 451 his (CAC) → tyr (TAC) |
| 7 | 13/07/2006 | Esc | H e R | 315 ser (AGC) → thr (ACC) | 447 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 8 A | 31/07/2006 | Esc | H e R | SM | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 8 B | 31/08/2006 | Esc | R | NA | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 9 | 23/08/2006 | Esc | H | SM | NA |
| 10 | 28/10/2007 | Esc | H e R | SM | SM |
| 11 | 28/09/2006 | Esc | H e R | SM | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 12 A | 06/10/2006 | LCR | H | SM | NA |
| 12 B | 23/11/2006 | Esc | NR | SM | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 13 A | 10/02/2006 | Esc | H | 315 ser (AGC) → asn (AAC) | NA |
| 13 B | 04/10/2006 | Esc | H e R | 315 ser (AGC) → asn (AAC) | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 14 | 17/11/2006 | Esc | H e R | SM | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 15 | 28/11/2006 | Esc | H e R | SM | 456 ser (TCG) → leu (TTG) |
| 16 | 08/12/2006 | Esc | H | 315 ser (AGC) → asn (AAC) | NA |

1. Cada número corresponde a um paciente e as letras correspondem aos diferentes isolados de um mesmos paciente.

2. Amostra clínica da qual foi isolado o microrganismo: Esc – escarro, LCR – Líquido Céfalorraquidiano, Linf – Secreção de linfonodo.

3. Resistência a drogas: H – isoniazida; R – rifampicina; NR – não realizado;

4. ser – serina; thr – threonina; gly – glicina; asn – asparagina; leu – leucina; tyr – tyrosina; his – histidina; SM – Sem mutações; NA – Não se aplica.

| Isolado | Sequência do gene <i>katG</i> |
|---------|--|
| H37RV | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 1 | ATCACCA <u>C</u> CGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 2 | ATCACCA <u>C</u> CGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 3 | ATCACCA <u>C</u> CGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 4A | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 4B | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 4C | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 4D | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 5 | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 6A | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 6B | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 6C | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 7 | ATCACCA <u>C</u> CGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 8A | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 8B | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 9 | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 10 | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACAAAATGGG |
| 11 | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 12A | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 12B | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 13A | ATCACCA <u>A</u> CGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 13B | ATCACCA <u>A</u> CGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 14 | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 15 | ATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| 16 | ATCACCA <u>C</u> CGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATGGG |
| | ***** . ***** |

Figura 4: Mutações observadas no códon 315 do gene *katG* ser (AGC) → thr (ACC) e ser (AGC) → asn (AAC) observados em 7 dos 17 isolados fenotípicamente resistentes à isoniazida.

| Isolado | Sequência do gene <i>katG</i> |
|---------|---|
| H37Rv | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 1 | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 2 | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 3 | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 4A | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 4B | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 4C | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 4D | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 5 | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 6A | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 6B | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 6C | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 7 | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 8A | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 8B | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 9 | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 10 | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 11 | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 12A | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 12B | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 13A | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 13B | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 14 | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 15 | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| 16 | GCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAG |
| | ***** . ***** |

Figura 5: Mutações silenciosas observadas no códon 297 gly (GGC) → gly (GGT) do gene *katG* observados em 2 dos 17 isolados fenotípicamente resistentes à isoniazida.

| Isolado | Sequência do gene <i>rpoB</i> |
|---------|---|
| H37Rv | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 1 | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 2 | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 3 | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 4A | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 4B | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 4C | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 4D | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 5 | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 6A | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 6B | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 6C | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 7 | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 8A | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 8B | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 9 | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 10 | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 11 | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 12A | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 12B | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 13A | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 13B | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 14 | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 15 | CCGACTGT <u>T</u> GGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| 16 | CCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTG |
| | ***** . ***** |

Figura 6: Mutações observadas no códon 456 ser (TCG) → leu (TTG) do gene *rpoB* observados em 12 dos 17 isolados fenotípicamente resistentes à rifampicina. O isolado 12 B apresentou o mesmo padrão de mutação embora não tenha sido confirmado fenotípicamente.

| Isolado | Sequência do gene <i>rpoB</i> |
|---------|---|
| H37 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 1 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 2 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 3 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 4A | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 4B | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 4C | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 4D | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 5 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 6A | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCTACAAGCG |
| 6B | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCTACAAGCG |
| 6C | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCTACAAGCG |
| 7 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 8A | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 8B | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 9 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 10 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 11 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 12A | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 12B | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 13A | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 13B | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 14 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 15 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| 16 | GCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCG |
| | *****.*****.***** |

Figura 7: Mutações no gene *rpoB* observadas no códon 447 ser (TCG) → leu (TTG) de 1 isolado e no códon 451 his (CAC) → tyr (TAC) em 3 dos 17 isolados fenotípicamente resistentes à rifampicina.

6. DISCUSSÃO.

A análise laboratorial do perfil de resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose é de grande importância para direcionamento da terapia mais apropriada, o mais precocemente possível, bem como, adoção de medidas preventivas contra a disseminação de microrganismos resistentes.

Dos 16 pacientes analisados, dez (62,5%) eram portadores de TBMDR, resistentes, portanto à R e H, cinco (31,2%) eram monorresistentes à H e um (6,3%) era monorresistente à R. Esses achados estão respaldados pela literatura em relação à rifampicina que pode ser considerada como um marcador para a multirresistência aos fármacos porque, raramente, observa-se monorresistência a ela (Miotto et al. 2006, Rosseti et al. 2002, Bahrmand et al. 2009).

Como foram analisados mais de um isolado por paciente, nota-se na Tabela V que dois pacientes (4 e 8) apresentaram monorresistência à R em determinado momento da doença, mas que os TS anteriores demonstraram ser compatíveis com TBMDR. Portanto, estes achados são compatíveis com populações bacterianas mistas, discutidas adiante e não enquadradas nesta análise como monorresistentes à R.

Dos 15 pacientes com resistência fenotípica à isoniazida, sete, (47%) apresentaram algum tipo de mutação no fragmento do gene *katG* sequenciado, descrito pela literatura como a região mais envolvida em mutações. Destes, cinco (71,4%) tiveram mutação apenas no códon 315 (figura 4), um (14,3%) apresentou mutação apenas no códon 297 (figura 5) e um (14,3%) apresentou duas mutações: códon 297 e 315 (Figuras 4 e 5).

Foram observados dois padrões de mutação no códon 315: ser (AGC) → thr (ACC) em 4 (67%) e ser (AGC) →asn (AAC) em dois (33%) dos pacientes. A mutação do códon 315 mais frequente, ser (AGC) → thr (ACC), observada nesse estudo está em acordo com o descrito na literatura para mutações no gene *katG* (Bostanadab et al. 2006, Silva et al. 2003) (Figura 4). Vários estudos relatam outras substituições no códon 315 como: ser (AGC) 315 → arg (AGG), ser (AGC) 315 → ile (ATC) (Bostanadab et. al 2006, Haas et al. 1997), porém não foram encontradas nos isolados estudados. Dentre os pacientes que apresentaram mutações no códon 315 do gene *katG*, a maioria (66%) era constituída por pacientes portadores de TBMDR. Miotto e colaboradores (2006) fizeram a mesma constatação ao analisar 206 isolados clínicos de *M.tuberculosis* procedentes da Itália no período de janeiro de 2002 a junho de 2005.

Embora estudos de resistência às drogas levantem a possibilidade de que substituições sinônimas ou silenciosas (que não se expressam fenotípicamente) sejam limitadas (Sreevatsan et al. 1997), no presente estudo foram encontradas mutações silenciosas no códon 297 gly (GGC) → gly (GGT), em dois isolados, ambos fenotípicamente resistentes à H sendo que o isolado 3 apresentou substituição concomitante no códon 315. O isolado 5 apresentou apenas a mutação silenciosa (figura 5) que não tem nenhum efeito sobre a resistência fenotípica detectada. Neste caso específico a mutação responsável pela expressão da resistência observada clínica e fenotípicamente encontra-se provavelmente em algum outro ponto do gene *katG*, não analisado neste estudo, ou em outros genes como *ahpC*, *inhA*, *kasA* que podem conferir este tipo de resistência e que já foram descritos em outros trabalhos (Ramaswamy et al.

2003, Silva et al. 2003). O mesmo raciocínio deve ser aplicado aos demais isolados (53%) que não tiveram confirmação genotípica da resistência apresentada nos testes fenotípicos.

Dos 11 pacientes com resistência fenotípica à R, dez (91%) apresentaram mutações entre as bases 1276 e 1356 correspondentes aos códons 432 a 458 do gene *rpoB* de *M. tuberculosis*. Esta alta frequência de mutação observada dentre os isolados resistentes a R, está em acordo com a literatura (Heep et al. 2001, Rigouts et al. 2007) e confirma a utilidade da análise desta região do gene *rpoB* na procura das mutações que conferem resistência a R.

Dentre os 11 pacientes que apresentaram mutação no gene *rpoB*, oito (72,7%) apresentaram a mutação ser (TCG) → leu (TTG) no códon 456, um paciente (9,1%) sofreu mutação ser (TCG) → leu (TTG), no códon 447, um paciente (9,1%) apresentou a mutação his (CAC) → tyr (TAC) no códon 451 e um (9,1%) paciente, (isolado 12 B), apresentou mutação no códon 456 ser→leu embora não tenha sido confirmado fenotípicamente.

De acordo com estudo realizado por Bahrmand e colaboradores (2009), analisando 286 cepas de *M. tuberculosis* obtidos de escarro de pacientes com TB pulmonar ativa, coletados em uma província na fronteira do Irã com Afeganistão, foram observadas mutações nos códons 432, 433, 436, 441, 444, 445, 448, 451, 452 e 456. Os autores afirmam que os códons 436, 441, 451 e 456 de *M. tuberculosis* são reportados mundialmente como sendo os mais envolvidos em mutações e salientam que ocorrem variações dependendo da região geográfica. Nossos achados são equivalentes a estudos realizados por pesquisadores que relatam a mutação no gene *rpoB* como a mais frequente no

códon 456 (TCG→TTG) conforme descrito por Heep e colaboradores (2001) que encontraram 65% de mutações no códon 456 em 93 isolados resistentes à R obtidos de pacientes na Alemanha.

Os estudos feitos com isolados de diferentes regiões do Brasil reportam frequências de mutações no gene *rpoB* semelhantes às encontradas em nosso estudo. Valim e colaboradores (2000) analisaram 100 isolados de *M. tuberculosis* provenientes de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, e detectaram 21 diferentes tipos de mutações em 82 isolados resistentes à R. As mutações mais frequentes foram nos códons 456 (54%), 451 (21%) e 441(7%). Em um outro estudo realizado com isolados de São Paulo e Rio de Janeiro, Miranda e colaboradores (2001) analisaram as bases moleculares de 18 isolados resistentes à R e observaram uma frequência de 52,9% de mutação no códon 456, seguido de mutações nos códons 451 (14,7%) e 438 (11,8%).

Neste estudo encontramos mutação no códon 447 de um paciente (nº 7) que codifica para ser (TCG) → leu (TTG) (figura 7). A substituição neste códon também foi encontrada por Valim e colaboradores (2000) em 2 isolados do Rio Grande do Sul.

O isolado do paciente 10 não apresentou nenhuma mutação no fragmento do gene *rpoB* sequenciado. Como já relatado por outros autores a não observação de mutação nas regiões mais frequentemente envolvidas com a resistência a drogas demonstra a necessidade de se analisar outras partes do gene à procura das bases moleculares referentes à resistência observada fenotípicamente (Valim et al 2000, Miranda et al. 2001. Bahrmand et al. 2009, Rigouts et al. 2007, Heep et al. 2001).

Nos pacientes 4, 6, 8, 12 e 13 que contribuíram com mais de um isolado, foi possível observar que dentre os MDR, dois (20%) apresentaram padrão fenotípico de infecções mistas (pacientes 4 e 8) devido a diferentes perfis de resistência das amostras coletadas em tempos e espécimes clínicos diferentes. Os isolados das primeiras amostras coletadas apresentaram-se como TBMDR e os posteriores apresentaram resistência apenas à H. Populações mistas são discutidas por vários autores (Warren et al. 2004, Shamputa et al. 2004, Hilleman et al. 2005) e necessitam ser melhor estudadas em nosso estado.

Com relação aos isolados com padrão de resistência fenotípico característico de populações bacterianas heterogêneas, pode-se afirmar que, infecções mistas são causadas simultaneamente por duas ou mais estirpes de *M. tuberculosis* e que podem ser confirmadas por DNA fingerprints (Shamputa et al. 2004). Na Tabela V podem-se observar que os dois primeiros isolados do paciente 4, coletados em agosto de 2005 e março de 2006 apresentaram padrão de resistência de TBMDR e os isolados posteriores, novembro de 2006 e abril de 2007 foram resistentes apenas à R. O mesmo aconteceu com isolados do paciente 8, onde a amostra coletada em julho de 2006 apresentou resistência à R e H, e a amostra coletada em agosto de 2006 apresentou resistência apenas à R. Sabe-se que um isolado, inicialmente resistente, não se sensibiliza após o início do tratamento, então pode-se inferir que se trata de infecções mistas (Warren et. al 2004, Shamputa et al. 2004, Hillemann et al. 2005).

De acordo com trabalho realizado por Li e colaboradores (2007), a resistência a uma segunda droga pode resultar tanto do desenvolvimento de resistência por tratamento irregular ou terapia inadequada como em

consequência de uma re-infecção exógena por um novo microrganismo já resistente. Nos isolados 13 A e 13 B as análises fenotípicas e moleculares comprovaram sem sombra de dúvida o desenvolvimento de TBMDR por falha na adesão ao esquema quimioterápico (Figura 6).

O paciente 12 que contribuiu com dois isolados, LCR e escarro, apresentou mutação no códon 456 ser (TCG) → leu (TTG) da amostra de escarro cujo TS não foi realizado devido a não recuperação do isolado. Como o primeiro isolado, recuperado da amostra de LCR foi fenotípicamente resistente apenas à H e o segundo isolado, de escarro, não teve o TS realizado, pode-se afirmar, baseado na técnica de sequenciamento, que houve desenvolvimento da resistência à R posteriormente à realização do TS na amostra de LCR. Este achado pode ser observado na Figura 6 (isolados 12 A e 12B) e explicado por Viedma e colaboradores (2005) que afirmarem que as análises de clusters de infecções por *M. tuberculosis* têm mostrado que em certas circunstâncias a TB é uma situação muito mais complexa do que aquela visão esquemática de uma estirpe infectando um hospedeiro.

As situações complexas encontradas na TB incluem recorrências causadas por re-infecção exógena; co-infecções simultâneas por mais de uma estirpe de *M. tuberculosis*; compartimentalização de infecção; diferentes estirpes infectando diferentes órgãos e o fenômeno da micro evolução levando ao aparecimento de variantes clonais dentro de um hospedeiro.

Unidades repetitivas espaçadoras e tipagem do número de variáveis *in tandem* MIRU/VNTR é uma ferramenta para confirmar a compartimentalização, isto é, infecções policlonais onde são encontradas diferentes estirpes infectando

diferentes órgãos. De acordo com Post e colaboradores (2004) a excisão de pulmão humano de paciente com tuberculose recém-falecido demonstrou resistência adquirida em locais físicos diversos do mesmo pulmão sugerindo a ocorrência de evoluções paralelas, isto é, emergência de resistência independente, em compartimentos separados do mesmo órgão sugerindo que amostras de escarro obtidos de um mesmo paciente pode conter subpopulações com mistura de bacilos resistentes e sensíveis concluindo que a observação de subpopulações mistas de organismos sensíveis e resistentes pode sugerir mutação adquirida recentemente. Esta explicação pode ser aplicada ao caso específico deste paciente (12) que além do *Mycobacterium tuberculosis* apresentava concomitantemente o *Mycobacterium leprae*.

A aplicação de testes moleculares na detecção de resistência pode nos fornecer informações surpreendentes sobre a origem e disseminação dos microrganismos na comunidade, contribuir com as análises epidemiológicas e favorecer a introdução da terapia correta mais precocemente.

7. CONCLUSÕES.

- O percentual de concordância entre os testes fenotípicos e genotípicos foi de 41% para H e 94% para R considerando-se o número de isolados, e de 40% e 91% considerando-se o número de pacientes.
- Foram observadas resistências fenotípicas à isoniazida em 71% dos isolados, correspondentes a 93,7% dos pacientes incluídos no estudo.
- A mutação no códon 315 do gene *katG* foi a única observada dentre as cepas resistentes a H (7/17).
- A frequência de substituições no códon 315 do gene *katG* foi de 57% para ser (AGC) → thr (ACC) e de 43% para ser (AGC) → asn (AAC).
- Foram observadas resistências fenotípicas à rifampicina em 71% dos isolados, representando 68,7% pacientes incluídos no estudo.
- As frequências de mutações observadas no gene *rpoB* foram de 76,5% para o códon 456 ser (TCG) → leu (TTG), 17,6% no códon 451 his(CAC) → tyr (TTG) e 5,9% no códon 447 ser (TCG) → leu (TTG).
- Dentre os isolados analisados, 46% eram de TBMDR correspondentes a 10 (62,5%) dos pacientes.

PERSPECTIVAS

A continuidade deste trabalho envolve análises moleculares para se estabelecer a relação genética entre as cepas isoladas, quer sejam elas de um mesmo paciente, ou de diferentes pacientes, mas com perfis de resistência a antibióticos semelhantes. Estas análises serão fundamentais para evidenciar a presença de mais de uma estirpe em um mesmo paciente. Igualmente, um melhor entendimento do desenvolvimento e/ou transmissão de cepas resistentes a antibióticos poderão ser obtidas com análises de isolados de diferentes pacientes, com perfis de resistência semelhante. Técnicas como RFLP-IS6110, VNTR/MIRU, são as mais utilizadas para essas análises e poderão ser aplicadas aos isolados nestes estudos futuros.

Esperamos a médio prazo poder implantar no laboratório de referência estadual para tuberculose, LACEN-GO, as técnicas de sequenciamento dos principais genes envolvidos no desenvolvimento da resistência às duas principais drogas usadas no tratamento da tuberculose.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adékambi T, Drancourt M 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp 65*, *sod A*, *rec A* and *rpo B* gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2095-2105.
- American Thoracic Society. Diagnostic 2000. Standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am Resp Crit Care Med* 161: 1376-1395.
- Amukoye E 2008. Multi drug resistant tuberculosis: a challenge in the management of tuberculosis. *African Journal of Health Sciences* 15: 6-13.
- Anthony RM, Schuitema ARJ, Bergval IL, Brown TJ, Oskam I, Klatser PR 2005. Acquisition of rifabutin resistance by a rifampicin resistant mutant of *Mycobacterium tuberculosis* involves an unusual spectrum of mutations and elevated frequency. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. <http://www.ann-clinmicrob.com/content/4/1/9>.
- Araújo-Filho JA, Vasconcelos Jr AC, Sousa EM, Silveira C, Sousa PTP, Severo KA, Vieira LF, Kipnis A, Kipnis APJ 2008. Multidrug-Resistant Tuberculosis: Case Reports Study in a Central State of Brazil. *BJID* 2008, 12: 94-98.
- Arnold C 2006. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiol Inf* 13: 120-128.
- Aziz MA, Laszlo A, Raviglione M, Rieder H, Espinal M, Wright A 2003. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. The World Health Organization/International Union against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on Surveillance for AntiTuberculosis Drug Resistance. Second edition.
- Bahrmand AR, Titov LP, Tasbiti AH, Yari S, Graviss EA 2009. High-Level Rifampin Resistance Correlates with Multiple Mutations in the *rpoB* Gene of Pulmonary Tuberculosis Isolates from the Afghanistan Border of Iran. *J Clin Microbiol* 47: 2744-2750.
- Bergval IL, Schuitema ARJ, Klatser PR, Anthony RM 2009. Resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* selected *in vitro* do not reflect the *in vivo* mechanism of Isoniazid resistance. *J Antimicrob Chemother* 64: 515-523.
- Boffo MMS, Mattos IG, Ribeiro MO, Neto ICO 2004. Tuberculosis associated to AIDS: demographic, clinical and laboratory characteristics of patients cared for at a reference center in the south of Brasil. *J bras pneumol*. 30:140-146.

- Bostanadab SZ, Velayati AA, Masjedi MR, Titov LP, Taghikhani M, Khazaei HA, Aghamohammadi A, Bahrmand AR 2006. *KatG* Mutation of Isoniazid-Resistant Isolated from Tuberculosis Patients. *Tanaffos* 5: 31-36.
- Bostanadab SZ; Bahrmand A; Titov L.P; Tagnikhani M 2007. Identification of mutations in the *rpoB* encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampicine-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Iran. *Tuberküloz ve Toraks Dergisi* 55: 370-377.
- Botasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A 2007. The Immuno-endocrine Component in the Pathogenesis of Tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology* 66: 166-175.
- Brasil 2002. MS/FUNASA/CRPHF/SBPT. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço, 5ª edição-Rio de Janeiro.
- Brasil 2004. II Consenso Brasileiro de Tuberculose – Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. *Jornal da SBPT* 30: 24-38.
- Brasil 2008. MS/SVS/DEVEP, 1ª edição, Brasília, DF. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias.
- BRASIL 2009¹. SVS ano 9 nº 2, julho de 2009. Boletim Epidemiológico eletrônico. Avaliado em <http://portal.saude.gov.br>
- BRASIL 2009². Comissão de Tuberculose da SBPT, Grupo de Trabalho das Diretrizes para Tuberculose da SBPT. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J Bras Pneumol* 35:1018-1048.
- Brito RC, Gounder C, Lima DB, Siqueira H, Cavalcante HR, Pereira MM, Kritski AL 2004. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated at an AIDS reference center general in Rio de Janeiro. *J Bras Pneumol* 30: 425-432.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eigimeier K, Garnieri T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *PNAS USA* 99: 3684-3689.
- Campos HS 1999. De onde vem a resistência. *Boletim de Pneumologia Sanitária* 7. Nº 1 - jan/jun 1999.
- Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, Rist N,

- Smelev NA 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bulletion of the World Health Organization* 4: 21-43.
- Carvalho WS, Miranda SS, Pesquero JL, Gomes MA 2007. Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. *RBCF* 43: 31-38.
- Cave MD, Eisenach KD, Templeton G, Salfinger GM, Bates JH, Crawford JT 1994. Stability of DNA fingerprint Pattern produced with IS 6110 in Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 32: 262-266.
- Chan ED, Laurel V, Strand MJ, Chan JF, Huynh NML, Goble M, Iseman MD 2004. Treatment and Outcome Analysis of 205 Patients with Multidrug-resistant Tuberculosis. *Am J Resp Care Med* 169: 1103-1109.
- Chimara E, Ferrazoli L, Leão SC 2004. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyr B* restriction fragment length polymorphism analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 45-48.
- Crofton J, Mitchison D 1948. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. *British Medical Journal* 2:1009-1015.
- Cunha AF, Frota CC 2005. Bases Moleculares da Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às Drogas Usadas no Tratamento da Tuberculose. *RBAC* 37: 157-161.
- Diguimbaye C, Hilty M, Ngandolo R, Mahamat HH, Pfyffer GE, Baggi F, Tanner M, Schelling E, Zinsstag J 2006. Molecular Characterization and Drug Resistance Testing of *M. tuberculosis* Isolates from Chad. *J Clin Microbiol* 44: 1575-1577.
- Di Pierre G, Bonara S 2004. Which agents should we use for the treatment of multidrug resistant *M. tuberculosis*? *JAC* 54: 593- 602.
- Donald PR, van Helder PD 2009. The Global Burden of Tuberculosis Combating Drug Resistance in Difficult Times. *NEJM* 360: 2393-2395.
- Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez R, Pando K, Kremer K, Roholl P, Arend SM, Van Soolingen D 2004. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol* 137: 460-468.

- Dubiley S, Kirillov E, Ignatova A, Stepanshina V, Shemyakin I 2007. Molecular Characteristics of the *Mycobacterium tuberculosis* LAM-RUS Family Prevalent in Central Russia. *J Clinical Microbiol* 45: 4036-4038.
- Ducati RG, Netto AR, Basso LA, Santos DS 2006. The Resumption of Consumption A review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 697-714.
- Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Hosseini SM, Raviglione MC 2005. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA* 22: 2767-2775.
- Espinal MA 2003. The global situation of MDR TB. *Tuberculosis* 83: 44-51
- Euzeby JP. List of bacterial names with Standing in Nomenclature. *Société de Bacteriologie Systematique et Vétérinaire France*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>). Acesso em 24 julho 2009.
- Fu LM, Shinnick TM 2007. Understanding the action of INH on a highly INH resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain using Genechips. *Tuberculosis* 87: 63-70 journal homepage: <http://intl.elsevierhealth.com/journals/tube>.
- Haas WH, Schilke K, Brand J, Amthor B, Weyer K, Fourie PB, Bretzel G, Sticht-Groh V, Bremer HJ 1997. Molecular Analysis of *katG* Gene Mutations in Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1601-1603.
- Heep M, Brandstätter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Gerdes SR, Niemann S 2001. Frequency of *rpoB* Mutations Inside and Outside the Cluster I Region on Rifampin-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *J Clin Microbiol* 39:107-110.
- Hillemann D, Kubica T, Agzamova R, Venera B, Rüsç-Gerdes S, Niemann S 2005 Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan. *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 1161-1167.
- Hijjar MA, Gerhardt G, Teixeira GM, Procópio MJ 2007. Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. *Rev Saúde Pública* 41: 50-58.
- Hunter RL, Olsen MR, Jagannath C, Actor JK 2006. Review: Multiple Roles of Cord Factor in the Pathogenesis of Primary, Secondary, and Cavitory Tuberculosis, Including a Revised Description of the Pathology of Secondary Disease. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 36: 371-386. Available online at www.annclinlabsci.org.

- Jain A, Dixit P 2008. Multidrug resistant to extensively drug resistant tuberculosis: What is next? *Journal Biosc* 33: 605-616.
- Jawetz, Melnick & Adelberg 2000. Microbiologia Médica, 21ª edição.
- Jenkins C, Claxton AP, Shorten RJ, McHugh TD, Gillespie SH 2005. Rifampicin Resistance in Tuberculosis Outbreak, London, England. *Emerg Infect Dis*. [serial on the internet]. Available from <http://www.cdc.gov.ncidod/EID/vol11no06/04-1262.htm>.
- Johnson R, Streicher EM, Louw GE, Warrewn M, Helden Pdvan, Victor TC 2006. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Issues Mol Biol* 8: 97-112.
- Kanduma EE, McHugh TD, Gillespie SH 2003. Molecular Methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J Appl Microbiol* 94: 781-791.
- Kim HJ, Kang CH, Kim YT, Sung SW, Kim JH, Lee SM, Yoo CG, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, Yim JJ 2006. Prognostic factors for surgical resection in patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J* 28: 576-580.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger CP, Winn Jr WC 2001. Diagnóstico Microbiológico - Texto e atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro. Translation of: AE Cury.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam NP, Valentim F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lazzarini LCO, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Kurepina N, Shashkina E, Mello FCQ, Gibson AL, Virgínio MJ, Marsico AG, Butler WR, Kreiswirth BN, Suffys PN, Lapa e Silva JR, Ho JL 2007. Discovery a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Lineage That is a Major Cause of Tuberculosis In Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 45: 3891-3902.
- Lazzarini LCO, Spindola SM, Bang H, Gibson AL, Weisenberg S, Carvalho WS, Augusto CJ, Huard RC, Kristki AL, Ho JL 2008. RD^{Rio} *Mycobacterium tuberculosis* Infection Is Associated with a Higher Frequency of Cavitory Pulmonary Disease. *J Clin Microbiol* 46: 2175-2183.
- Marttila HJ, Soini H, Huovinen P, Viljanen MK. 1996 *KatG* mutations in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from finnish patients. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2187-2189.

- Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN 2006. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. *Microbiology Reviews. J Inf Dis Clin* 19: 658-685.
- Miranda SS, Kristki AL, Filliol I, Mabilat C, Panteix G, Drouet E 2001. Mutations in the *rpoB* Gene of Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Brazil and France. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 247-250.
- Miotto P, Piana F, Penati V, Canducci F, Migliori GB, Cirillo DM 2006. Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Strains Isolated in Italy. *Journal Clin Microbiol* 44: 2485-2491.
- Mitchison DA 1998. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. *Int J Tuberculosis Lung Diseases* 2: 10-15.
- Moström P, Gordan M, Sola C, Ridell M, Rastogi N 2002. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 8: 694-704.
- Murray M, Alland D 2002. Methodological Problems in the Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *Am J Epidemiol* 155: 565-571.
- Niero CV, Leão SC 2004. Limitações do uso do fragmento mtp 40 como marcador de diferenciação entre *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis*. *Braz J Pulmonology* 30: 496-500.
- OMS 2000. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World, report nº 2. Prevalence and Trends.
- OMS 2008. Global tuberculosis control - *Surveillance, planning, financing*. Who report 2008.
- Pandolfi JR, Malaspina AC, Santos ACB, Suffys PN, Oellemann MAC, Valentini SR, Leite CQF 2007. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 28: 251-257.
- Paramasivan CN, Venkataraman P 2004. Review Article. Drug resistance in tuberculosis in India. *Indian J Med Res* 120: 377-386.

- Post FA, Willcox PA, Mathema B, Steyn LM, Shean K, Ramaswamy SV, Graviss EA, Shashkina E, Kreiswirth BN, Kaplan G 2004. Genetic Polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients with Chronic Multidrug-Resistant Tuberculosis. *J Infect Dis* 190: 99-106.
- Ramaswamy SV, Reich R, Jou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, Quitugua T, Graviss EA 2003. Single Nucleotide polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimic Agents and Chem* 47:1241-1250.
- Raviglione MC, Snider DE, Jr Kochi A 1995. Global epidemiology of tuberculosis: Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 273: 220-226.
- Raviglione MC, Smith IM 2007. XDR tuberculosis – Implications for Global Public Health. *NEJM* 356: 656-659.
- Rigouts L, Nolasco O, Rijl P, Nduwamahoro E, Deun AV, Ramsay A, Arevalo J, Portaels F 2007. Newly Developed Primers for Comprehensive Amplification of the *rpoB* Gene and Detection of Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 45: 252-254.
- Rinder H, Feldmann K, Tortoli E, Grosset J, Casal M, Ritcher E, Rifai M, Jarlier V, Vaquero M, Rüscher-Gerder S, Cambau E, Gutierrez J, Löscher T 1999. Culture-Independent Prediction of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by *katG* Gene Analysis Directly From Sputum Samples. *JMD* 4: 145-152.
- Rosenberg NA, Tsolaki AG, Tanaka MM 2003. Estimating change rates of genetic markers using serial samoles: applications to the transposon IS 6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Theor Popul Biol* 63: 347-363.
- Rossetti ML, Valim ARM, Silva MSN, Rodrigues VS 2002. Resistant tuberculosis: molecular review. *Rev Saúde Publica* 36: 525-532.
- Sachan AS, Gupta RK, Katoch VM, Mishra K, Jakhmola P 2002. Detection of Rifampicin Resistant Mutant Gene in *Mycobacterium tuberculosis* by line Probe Assay. *Ind J Tub* 49: 209-211.
- Shamputa IC, Rigouts L, Eyongeta LA, Aila NAE, van Deun A, Salim AH, Willery E, Locht C, Supply P, Portaels F 2004. Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients. *J Clin Microbiol* 42: 5528-5536.

- Sharma SK, Mohan A 2006. Multidrug-resistant tuberculosis: a menace that threatens to destabilize tuberculosis control. *Chest* 130: 261-272.
- Siddiqi N, Shamim M, Hussain S, Choudhary RK, Ahmed N, Prachee, Banerjee S, Savithri GR, Alam M, Pathak N, Amin A, Hanief M, Katoch VM, Sharma SK, Hasnain SE 2002. Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in North India. *Antimicrob Agents and Chem* 46: 443-450.
- Siddiqi S, Takhar P, Baldeviano C, Glover W, Zhang Y 2007. Isoniazid Induces Its Own Resistance in Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents and Chem* 51: 2100-2104.
- Silva MSN, Senna SG, Ribeiro MO, Valim ARM, Telles MA, Kritski A, Morlock GP, Cooksey RC, Zaha A, Rossetti MLR 2003. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* Genes of Brazilian Isoniazid-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 41: 4471-4474.
- Silva JRL, Boechat N 2004. The resurgence of tuberculosis and the impact of the study of pulmonary immunopathogenesis. *J Bras Pneumol* 30: 478-484.
- Silva NA, Villela PMS, Boschiero C, Andrade JLF, Coutinho LL. Método alternativo de purificação de produto de PCR para sequenciamento 2008. Resumos do 54^o Congresso Brasileiro de Genética. 16 a 19 de setembro de 2008. Disponível em: tuberculosis: <http://web2.sbg.org.br>. Visualização em: 20 de fev. 2009.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9869-9874.
- Thierry D, Noel AB, Frébault VVL, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS 6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 28: 2668-2673.
- Tibayrenc M 2005. Bridging up the gap between molecular epidemiologists and evolutionists. *Trends Microbiol* 13: 575-580.
- Timmins GS, Deretic V 2006. Mechanisms of action of isoniazid. Micro review. *Mol Microbiol* 62: 1220-1227.
- Valim ARM, Rossetti MLR, Ribeiro MO, Zaha A 2000. Mutations in the *rpoB* Gene of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Brazil. *J Clin Microbiol* 38: 3119-3122.

- van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, MacAdam R, Shinnick TM 1993. Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology. *J Clin Microbiol* 31: 406-409.
- van Soolingen D, Hermans PW, Haas PE, Soll DR, van Embden JD 1991. Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29: 2578-2586.
- van Soolingen D, Haas PE, Hermans PW, van Embden JD 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* 235:196-205.
- van Soolingen D 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 249: 1-26.
- Viedma DG; Rodriguez NA, Andrés S, Serrano MJR, Bouza E 2005 Characterization of Clonal Complexity in Tuberculosis by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number Tandem Repeat Typing. *J Clin Microbiol* 43: 5660-5664.
- Vynnycky E, Nagelkerke N, Borgdorff MW, van Soolingen D, Van Embden JDA, Fine PEM 2001. The effect of age and study duration on the relationship between "clustering" of DNA fingerprint patterns and the proportion of tuberculosis disease attributable to recent transmission. *Epidemiol Infect* 126: 43-62.
- Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, van Pittius, van Helden PD 2004. Patients with Active Tuberculosis often Have Different Strains in the Same Sputum Specimen. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 610-614.
- Wayn LG, Kubica GP 1986. Genus *Mycobacterium*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2: 1436-1457.
- Woods GL 2000. Susceptibility Testing for *Mycobacteria*. *CID* 31: 1209-1215.
- Zhao M, Li X, Xu P, Shen X, Gui X, Wang L, DiRiemer K, Mei J, Gao Q 2009. Transmission of MDR and XDR Tuberculosis in Shanghai, China. *PLoS ONE journal*. Pone.0004370 | www.plosone.org, Vol 4 Issue 2.

ANEXOS

A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFGO



PROTOCOLO Nº 01
26/01/2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

I – Identificação:

- Título do projeto: Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* induzidos em condições de stress pela resposta imune de pacientes tuberculosos.
- Pesquisador Responsável: Ana Paula Junqueira Kipinis
- Instituição responsável: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ UFG
- Data de apresentação ao COEP: 26/01/2005

II – Objetivos:

Identificar antígenos protéicos de *M tuberculosis* capazes de discriminar pacientes tuberculosos de sadios. Determinar o padrão de reconhecimento destes antígenos por células T CD4/CD8, selecionar antígenos candidatos à vacina.

III – Sumário do projeto:

- Descrição e caracterização da amostra:

Pacientes tuberculosos recrutados no ambulatório de tuberculose do Hospital de Doenças Tropicais.

Os controles serão convidados entre funcionários, estudantes, e/ou estagiários do HDT ou IPTSP

Critérios de inclusão e exclusão: Serão 50 pacientes:

- 1) tuberculosos com tuberculose pulmonar com idade de 30 a 60 com diagnóstico comprovado pela reação positiva ao PPD
- 2) Pacientes com outras doenças que acometem o pulmão
- 3) Pacientes hansênicos.
- 4) Pacientes controles com idade e sexo pareados para cada paciente com tuberculose.

- Adequação da metodologia:

- Adequada para o objetivo proposto.
- Adequação das condições:
- adequado

IV – Comentários do relator frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:

O projeto visa a caracterização de antígenos para futuros candidatos a vacinas a tuberculose através de seleção de antígenos que estimulem uma resposta imune protetora em pacientes sadios e doentes *in vitro*. Os laboratórios envolvidos possuem as condições necessárias para o desenvolvimento do projeto. A identificação de antígenos candidatos a vacina não fornecerá um benefício direto ao

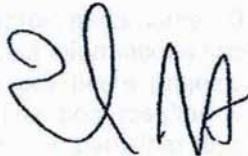
paciente (além da informação do número de células CD4 e CD8 em seu sangue), como é esclarecido no termo de consentimento, porém poderá fornecer grandes benefícios à comunidade. O paciente será acompanhado e tratado da mesma forma, independente de participar ou não do projeto, sendo garantido o sigilo de sua identidade. A coleta de 20 mL de sangue do paciente oferece um risco mínimo para este, portanto, a análise de riscos e benefícios justifica a execução do trabalho. Os pesquisadores mencionam a utilização de soro estocado de pacientes com hanseníase, entretanto, não apresenta um termo de consentimento Livre e esclarecido para utilização destes soros no projeto atual. A não utilização destes soros não compromete a pesquisa, porém, os pesquisadores devem enviar ao comitê de ética da UFG o TCLO demonstrando que os pacientes estão cientes da utilização destes soros, caso queiram utilizá-lo.

Diante do exposto, sou favorável a aprovação do mesmo.

VI – Data da reunião: 25/02/2005

Assinatura do relator:

Assinatura do Coordenador/COEP:

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters that appear to be 'E' and 'M'.

B - Termo de consentimento

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. IPTSP

Rua Delenda Rezende de Melo, S/N - Setor Universitário - Goiânia - GO.CEP 74605-050
Fone (062)3521.1837 - 3209.6102 - FAX (062)3521.1839

Consentimento de Participação na pesquisa

Título do projeto: **Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos pela resposta imune de pacientes tuberculosos.**

Nome do pesquisador responsável: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis, DVM, Ph.D.
Contato para problemas e dúvidas decorrentes desta pesquisa: Dr. João Alves de Araújo Filho, Médico, telefone: 62 3225-4971.

Você está sendo convidado a participar, voluntariamente, em uma pesquisa que será conduzida na Universidade Federal de Goiás (Goiânia-Goiás). Esta pesquisa tentará identificar proteínas do *Mycobacterium tuberculosis* (bactéria que causa a doença tuberculose) que são reconhecidas pelo sangue (soro e células) de pessoas saudáveis e pacientes com tuberculose.¹

O pesquisador gastará aproximadamente 20 minutos com você para: a) explicar o motivo da pesquisa, anotar algumas informações sobre o seu estado de saúde atual e pedir o seu consentimento para participar neste projeto. Neste período, um questionário será preenchido para facilitar a análise dos resultados futuramente. b) o seu sangue será coletado (20 mL). Se você decidir não participar da pesquisa, você não terá seu tratamento ou assistência interrompida. Você pode retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que o seu tratamento ou acompanhamento pelo Hospital de Doenças Tropicais seja interrompido (Goiânia, Goiás, Brasil).

Embora não exista nenhum risco em potencial durante a coleta de sangue, algumas vezes podem ocorrer vermelhidão e dor no local da coleta. Algumas pessoas podem desmaiar durante a coleta. Se isto acontecer interromperemos a sua participação imediatamente. Para coletar o seu sangue, o seu braço será limpo e esterilizado com álcool, depois de garrotear a parte superior do seu braço o sangue será coletado usando agulha e seringas estéreis. Para a coleta, será usada uma seringa de 20 mL. Não é possível identificar todos os problemas que podem ocorrer durante esse procedimento, mas nós (médico, enfermeira e o pesquisador) tomamos todas as medidas para minimizar os riscos desconhecidos desse procedimento.

Os resultados sobre a sua saúde e dos testes realizados com o seu sangue serão mantidos confidenciais pela pesquisadora responsável. Os seus dados pessoais não serão revelados em nenhum momento. Os resultados deste estudo serão publicados numa revista científica internacional.

Participação

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Se você decidir participar deste estudo, você poderá desistir a qualquer momento sem que você seja penalizado ou perca a sua assistência no Hospital de Doenças Tropicais. A sua assinatura provará que você leu, entendeu e deu o seu consentimento para participar desta pesquisa. Sua assinatura também provará que você está recebendo uma cópia deste documento.

Nome do participante (letra de forma)

Testemunha: nome e RG

Assinatura

____/____/____
Data

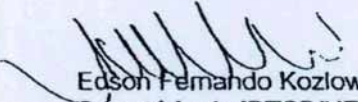
E - Parecer da Diretoria do IPTSP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. IPTSP
Rua Delenda Rezende de Melo, S/N - Setor Universitário - Goiânia – GO.CEP 74605-050
Fone (062)3521.1837 – 3209.6102 - FAX (062)3521.1839


C E R T I D ã O

Certificamos que em reunião do Conselho Diretor do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, realizada no dia 27 de outubro de 2004, foram discutidos e aprovados os seguintes projetos de pesquisa: "Perfil sócio-demográfico e clínico epidemiológico dos pacientes portadores de infecção HIV/aids atendidos no Serviço de Atendimento Especializado (SAE), Goiânia, de 2001-2004" - Responsável: Profª. Ms. Ana Maria de Oliveira; "Prevalência de microorganismos Gram-negativos produtores de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL) em sítios estéreis em Hospitais de Goiânia " – Responsável: Profª. Drª. Fabiana Cristina Pimenta; "Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do Mycobacterium tuberculosis induzidos pela resposta imune de pacientes tuberculosos" – Responsável: Profª. Drª. Ana Paula Junqueira Kipnis; "Atividade Antimicrobiana do Álcool Etilico 70,0% em Canetas Odontológicas de Alta Rotação" – Responsável: Prof. Dr. Cleômenes Reis.

Goiânia, 28 de outubro de 2004


Edson Fernando Kozlowski
Secretário do IPTSP/UFG

Tendo em vista Certidão expedida, encaminhe-se à Profª. Drª. Lucimeire Antonelli da Silveira, para os devidos fins.


Profª. Drª. Divina das Dores de Paula Cardoso
Diretora do IPTSP/UFG

F- Parecer do SUS e Secretaria Estadual da Saúde

Goiânia, 04 de março de 2005

Sra. Pesquisadora
ANA PAULA KIPINIS
Proponente de Projeto no Programa Pesquisa para o SUS - C&T em Saúde em
Goiás

Prezada Pesquisadora!

Com satisfação vimos comunicar que seu projeto intitulado
/Caracterização dos antígenos proteicos naturais e recombinantes do
Mycobacterium tuberculosis pela resposta imune de pacientes tuberculosos
atendidos pelo Sistema Unico de Saúde de Goiânia/ foi APROVADO, com
valor integral, conforme solicitado.

Estaremos proximamente convocando para concretizar a concessão dos
recursos solicitados, tão logo sejam disponibilizados.
Recomendamos providenciar documentação, conforme exigências do Edital.

Atenciosamente

Comitê Gestor
Pesquisa para o SUS - C&T em Saúde Goiás
SECTEC-GO

--
Esta mensagem foi verificada pelo sistema de antivírus e
acredita-se estar livre de perigo.

Dr. Divina dos Dores da Paula Cardoso
Diretora do IPT/SUFG



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, S/N- Setor Universitário - Goiânia-GO - CEP 74605-050- Fone: (062) 209-6103/09

Ofício nº 069/05

Goiânia, 15 de março de 2005

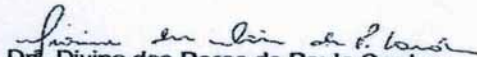
Da Diretora do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG
À Dep. Profª. Raquel Teixeira
MDª. Secretária de Ciências e Tecnologia do Estado de Goiás
Assunto: Termo de aceitação

Senhora Secretária,

Juntamente com nossos cumprimentos, apresentamos a V. Sª. o presente Termo de Aceitação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como Instituição executora do projeto "Caracterização dos antígenos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos em condições de stress pela resposta imune de pacientes tuberculosos atendidos pelo SUS - Goiânia", sob a responsabilidade da Pesquisadora Profª. Drª. Ana Paula Junqueira Kipnis.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos,

Atenciosamente,


Profª. Drª. Divina das Dores de Paula Cardoso
Diretora do IPTSP/UFG