



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

Lorena Cristina Santos

**Análise de resistência a antimicrobianos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*
isoladas no estado de Goiás**

Goiânia

2010



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

11. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

12. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Lorena Cristina Santos		
CPF:	00658645145	E-mail:	lorenacsantos@yahoo.com.br
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Vínculo Empregatício do autor			
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	DF
CNPJ:			
Título:	Análise de resistência a antimicrobianos de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isoladas no estado de Goiás		
Palavras-chave:	Tuberculose, resistência, MDR-TB		
Título em outra língua:	A high prevalence of resistance in new tuberculosis cases of midwestern Brazil		
Palavras-chave em outra língua:	Tuberculosis, resistance, MDR-TB		
Área de concentração:	Microbiologia		
Data defesa: (07/12/2010)			
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical		
Orientador(a):	Andre Kipnis		
CPF:	075.965.498-02	E-mail:	akipnis@iptsp.ufg.br
Co-orientador(a):	Ana Paula Junqueira kipnis		
CPF:	37014692100	E-mail:	anapaula@iptsp.ufg.br

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: ____ / ____ / ____

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

Lorena Cristina Santos

**Análise de resistência a antimicrobianos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*
isoladas no estado de Goiás**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: André Kipnis

Co-orientadora: Ana Paula Junqueira Kipnis

Este trabalho foi realizado com o auxílio e apoio financeiro do CNPq e CAPES

Goiânia-GO

2010

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

S237a Santos, Lorena Cristina.
Análise de resistência a antimicrobianos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas no Estado de Goiás [manuscrito] / Lorena Cristina Santos. - 2010.
114 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. André Kipnis; Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Junqueira Kipnis.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2010.
Bibliografia.
Anexos.

1. Tuberculose – Goiás (Estado) 2. Multidroga resistentes. 3. *Mycobacterium tuberculosis*. I. Título.

CDU: 616-002.5(817.3)

Trabalho realizado no Laboratório de Bacteriologia Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás sob orientação do Dr. André Kipnis e co-orientação da Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis.

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Lorena Cristina Santos

Orientador (a): André Kipnis

Co-orientador (a): Ana Paula Junqueira-Kipnis

Membros:

MEMBROS TITULARES	
Membro 1: André Kipnis (Orientador)	
Membro 2: Ildinete Silva Pereira	Instituição: UnB-DF
Membro 3: Flávio Ribeiro de Araújo	Instituição: Embrapa - MS
Membro 4: Maria Claudia de Porfírio B. André	Instituição: IPTSP-UFG
Membro 5: Geraldo Sadoyama Leal	Instituição: IPTSP-UFG
MEMBROS SUPLENTE	
Suplente 1: Luiz Artur Mendes Bataus	Instituição: ICB -UFG
Suplente 2: Alessandra Marques Cardoso	Instituição: PUC-GO
Suplente 3: João Alves de Araújo	Instituição: IPTSP-UFG
Suplente 4: Adriana Guiliardi	Instituição: IPTSP-UFG

Data: 07/12/10

*Aos meus queridos: Luiz, Mara, Leandro,
Caio, Bruna e Georthon.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ajudar em todo e qualquer momento, sempre me dando forças e me mostrando que não devo desistir.

Aos professores André Kipnis e Ana Paula Junqueira-Kipnis, pela confiança, conhecimento, aprendizado, compreensão, e acima de tudo, pelas várias oportunidades me oferecidas.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, por estarem sempre ao meu lado me incentivando. Por serem meu apoio e meu refúgio.

Ao Georhton, por estar ao meu lado em mais uma conquista, sempre me compreendendo e me apoiando, onde quer que eu esteja.

A minha querida tia Iara Geni Santos Diniz (em memória). Um exemplo de força, determinação e sabedoria.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Bacteriologia Molecular e do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP que passaram todo ou parte desses anos comigo. Em especial a Alyne Melo Pereira, Hesther de Macedo Bousquet, Mariana Davi Pinto, Maria Claudia P. André e Hernane Bahia.

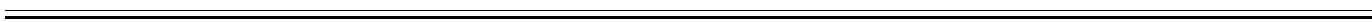
Ao pesquisador Dr. Don Mark Estes por me receber em seu laboratório e a todos os colegas da University of Texas Medical Branch, pelo aprendizado durante meu doutorado sanduíche. Em

**especial, a Simone, ao Claudio e ao Bernardo, que por algum tempo foram mais que amigos, mas
minha família nos EUA.**

**Aos colegas de pós-graduação, em especial do Laboratório de Imunopatologia, e aos funcionários do
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.**

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

**Aos membros da banca de qualificação: Dr. João Alves de Araújo, Dra. Maristela Pereira e Dra.
Maria Cláudia P. André, pelas críticas e sugestões.**



SUMÁRIO

Resumo.....	I
Summary.....	ii
1-Introdução.....	1
1.1-O gênero <i>Mycobacterium</i>	1
1.2-Aspectos imunopatológicos da tuberculose.....	3
1.3-Epidemiologia da tuberculose no Brasil e no mundo.....	5
1.4-Estratégias de controle e tratamento da tuberculose.....	5
1.4.1-Políticas de controle.....	5
1.4.2- Vacinação.....	7
1.4.3- Terapia antimicrobiana.....	8
1.5- Bases moleculares da resistência às drogas da TB.....	11
1.5.1- Mecanismos de ação e resistência das drogas utilizadas no tratamento da tuberculose.....	12
1.5.1.1- Isoniazida (H).....	13
1.5.1.2- Rifampicina (R).....	16
1.5.1.3- Pirazinamida (Z).....	19
1.5.1.4- Etambutol (E).....	20
1.5.1.5- Estreptomicina (S).....	21
1.5.1.6- Drogas de segunda linha.....	22
1.5.2- Epidemiologia da resistência a drogas anti-tuberculose.....	25
1.5.3- Fatores de risco associados à resistência a drogas na tuberculose.....	26
2-Justificativa.....	28
3-Objetivos.....	30
3.1- Objetivo Geral.....	30
3.2- Objetivos específicos.....	30
4-Metodologia.....	31
5-Resultados-Manuscrito 1.....	32
6-Considerações finais.....	39
7- Conclusões.....	41
8- Referências Bibliográficas.....	42
9- Manuscrito 2 submetido ao periódico <i>Infection, Genetics and Evolution</i>	61

TABELAS E FIGURAS

Figura 1 Estrutura da parede celular micobacteriana	2
---	---

Figura 2	Mecanismo de ação da isoniazida e aquisição de resistência.....	13
Figura 3	Esquema representativo dos experimentos realizados para a análise de resistência aos antimicrobianos de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isoladas no estado de Goiás.....	31
Tabela 1	Esquema de tratamento para tuberculose utilizado no Brasil.....	9
Tabela 2	Esquema de tratamento atualizado para tuberculose utilizado no Brasil.....	10

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ahpC	Alquil-hidroperóxido redutase
Alr	Alanina racemase
Am	Amicacina
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
Cm	Capreomicina
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida
Ddl	D-Alanina ligase
DCs	Células Dendríticas
DCS	D-cicloserina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOTS	Directly Observed Therapy Short-Course
E	Etambutol
Eto	Etionamida
FQs	Fluoroquinolonas
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana
H	Isoniazida
katG	Catalase-peroxidase
kasA	β -cetoacil-ACP sintase
KDa	Kilo Daltons
Km	Canamicina

L	Levofloxacina
MDR-TB	Tuberculose Multi Resistente a Drogas
MOTT	Mycobacteria Other than Tuberculosis
MIC	Concentração Inibitória Mínima
µg/ml	Micrograma/mililitro
O	Ofloxacina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Ácido para-aminosalicílico
Pb	Pares de base
PNC-TB	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
POA	Ácido pirazinóico
PZAse	Pirazinamidase
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNAr	RNA ribossômico
RNAt	RNA transportador
RNAP	RNA Polimerase
ROS	Espécies reativas do Oxigênio
RRDR	Região determinante de resistência à Rifampicina
Z	Pirazinamida
R	Rifampicina
S	Estreptomicina
TB	Tuberculose
T	Terizidona

V Viomicina

XDR-TB Tuberculose Extensivamente Resistente

RESUMO

A tuberculose (TB) é um problema de saúde pública em todo o mundo. Nos casos confirmados de tuberculose (TB) no Brasil, preconiza-se o esquema multidroga terapêutico que combina diferentes drogas por um período mínimo de 6 meses de tratamento. Devido, principalmente, ao tratamento inadequado, a emergência e disseminação de linhagens de *M. tuberculosis* multi resistentes a drogas se tornou uma séria ameaça. Atualmente, linhagens resistentes a pelo menos uma droga utilizada no tratamento da TB têm sido um dos principais fatores que impedem o controle efetivo da doença. De acordo com a OMS, linhagens multi-droga resistentes (MDR-TB) são aquelas resistentes a no mínimo isoniazida (H) e rifampicina (R), as principais drogas utilizadas no tratamento da TB. As principais mutações responsáveis por desenvolvimento de resistência à H e R acontecem principalmente em algumas regiões dos genes *katG*, *inhA* e *rpoB*, respectivamente. No presente estudo foi analisado o perfil de suscetibilidade de *M. tuberculosis* isolados de 132 pacientes atendidos em um hospital de referência em doenças infecciosas em Goiânia-Goiás, no período de janeiro de 2006 a julho de 2007. Foram coletados dados clínicos, epidemiológicos e utilizados testes de susceptibilidade à drogas, sequenciamento parcial dos genes *katG* e *rpoB*, análise de mutação por PCR do gene *inhA* e genotipagem por RFLP-IS6110. Foi observada uma alta frequência de resistência à drogas em pacientes virgens de tratamento (13,6% de resistência a no mínimo uma das droga testada e 6,1% de MDR-TB), e um alto grau de polimorfismo de DNA entre as linhagens resistentes. Estes resultados sugerem que a prevalência de linhagens resistentes na região está subestimada e que resistência aos antimicrobianos não está associada a um surto específico na região.

SUMMARY

Tuberculosis (TB) is a serious global public health. In Brazil for the confirmed TB cases is recommended a multi-drug therapy regimen which combines different drugs during at least 6 month. However, because of treatment inconsistency, the emergency and spread of drug resistant *M. tuberculosis* become a serious threat. Actually, strains resistant to at least one drug used in the TB treatment have been one of the main factor that avoid the effective TB control. According to WHO *M. tuberculosis* strains that are resistant to at least INH and RMP, the key drugs used in the TB treatment, are considered multidrug resistant (MDR-TB). The main mutations responsible for INH and RMP resistance occur at some specific regions in the *katG*, *inhA* and *rpoB* genes. We analyzed by phenotypic and genotypic methods the susceptibility profile of *M. tuberculosis* isolated from 132 patients treated at a reference hospital in Goiânia-Goiás, between January of 2006 and July of 2007 and then performed the resistant strains genotypic identifications by RFLP-IS6110. Additionally, clinical and epidemiological informations from the patients was collected. A high frequency of drug resistance was observed in previously untreated patients (13.6% to at least one antibiotic and 6.1% MDR-TB), and a high DNA polymorphism was observed among these strains. Our results suggest that the prevalence of resistant TB in Goiás is underestimated and that resistance in new TB cases was not associated with an outbreak in this region.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Mycobacterium*

A família Mycobacteriaceae consiste em dois gêneros, *Amycolicoccus* e *Mycobacterium*, sendo este o de maior importância clínica, contendo 181 espécies e 11 subespécies, algumas das quais são patogênicas para humanos e animais, e outras saprófitas. São bacilos finos, ligeiramente curvos, não móveis e não formadores de esporos. Possuem um alto conteúdo guanina-citosina (61-71%) e um alto conteúdo lipídico na parede celular, que constituem mais da metade do peso seco das micobactérias. Contudo, a composição lipídica dos bacilos, pode variar durante o ciclo na cultura, dependendo da disponibilidade de nutrientes.

O conteúdo lipídico é constituído principalmente por ácidos micólicos, que são longas cadeias de ácido graxos dispostas em uma estrutura de envelope, distinguindo as micobactérias das demais bactérias (Figura 1). Tal estrutura pode atuar como reservas de carbono e energia, mas também está envolvida na composição e função de membranas e organelas membranosas da célula. Este revestimento lipídico confere algumas características peculiares do gênero *Mycobacterium* como: álcool-ácido resistência (BAAR), extrema hidrofobicidade, resistência a diversos fatores, incluindo vários antibióticos, e distintas propriedades imunológicas. Tal fato, também contribui para a lenta taxa de crescimento de algumas espécies, devido à restrita captação de nutrientes.

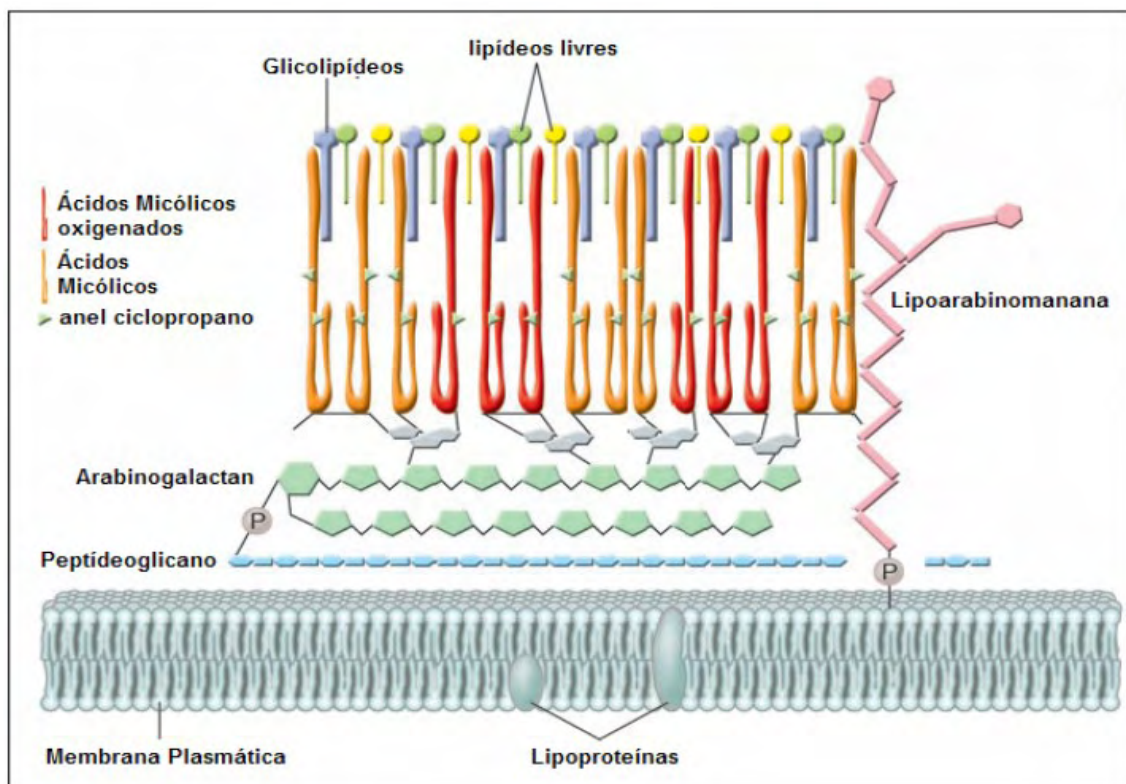


Figura 1- Estrutura da parede celular micobacteriana adaptado de Riley 2006

Apesar de exibir tais características em comum, as espécies pertencentes ao gênero apresentam variabilidade em muitos aspectos. Dessa forma, os membros cultiváveis do gênero *Mycobacterium* podem ser distinguidos em dois grupos: o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e as chamadas micobactérias atípicas, ou não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (MOTT- mycobacteria other than tuberculosis) .

As MOTTs são usualmente de crescimento rápido e saprófitas, embora algumas espécies possam apresentar caráter oportunista ou letal, com mais de 50 espécies associadas a doenças em humanos . O CMTB, formado pelas espécies geneticamente relacionadas *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* e *M. pinnipedi*, são indubitavelmente patogênicos, responsáveis por causar tuberculose (TB) em humanos e animais . *M. tuberculosis* é o principal agente etiológico da TB em humanos, representando a quarta doença com maior número de casos de morte associados a um único agente infeccioso bacteriano e a primeira entre indivíduos infectados com o HIV .

Linhagens virulentas de *M. tuberculosis*, em geral, produzem colônias secas e ásperas em meios sólidos, grumos na superfície de meios líquidos e formação de serpentinas em esfregaços. Em contraste, micobactérias não virulentas ou bacilos atenuados, desenvolvem colônias lisas, não formam grumos e se distribuem randomicamente em agregados quando visualizadas em microscópio óptico .

Estas características fenotípicas peculiares entre as espécies virulentas de *M. tuberculosis* têm sido atribuídas ao componente trealose 6,6'-dimecolato, também conhecido como fator corda. Este componente foi descrito como um glicolípido formado por duas moléculas de ácido micólico frouxamente ligadas à camada exterior da parede celular. Uma série de atividades biológicas têm sido relacionadas à este componente, como patogenicidade, toxicidade e proteção contra a resposta imune do hospedeiro. Contudo, tal fator não é essencial para a multiplicação bacilar .

1.2 Aspectos Imunopatológicos da tuberculose

Normalmente, *M. tuberculosis* penetra no hospedeiro pelo pulmão, após inalação de gotículas contendo bactérias expelidas por um indivíduo doente. *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular que infecta células fagocíticas apresentadoras de antígenos (APCs), incluindo macrófagos alveolares, macrófagos pulmonares e células dendríticas (DCs). O patógeno pode sobreviver nestas células, em fagossomos modificados, usando múltiplos mecanismos para evadir tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo, incluindo inibição da maturação do fagossoma, resistência a mecanismos microbianos inatos e defesas do hospedeiro mediadas por citocinas, e inibição da apresentação de antígenos. Dessa forma, se não imediatamente morto, pode invadir o hospedeiro gerando uma infecção e/ou doença .

Apesar do agente causador da TB humana ser altamente infectante, sua capacidade em desenvolver doença clínica é relativamente baixa. Estima-se que nove em cada 10 indivíduos infectados com *M. tuberculosis* sejam saudáveis. Isso ocorre, porque o patógeno, quando não eliminado, pode persistir por anos residindo no interior de macrófagos no granuloma e evadindo à eliminação pela resposta imune do hospedeiro. Esta permanência no hospedeiro pode progredir para uma TB ativa resultando em uma doença primária, permanecer latente por toda a vida do hospedeiro, ou anos depois, resultar em uma reativação quando há uma falência da imunidade mediada por células T . Os fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença não foram totalmente elucidados, mas, de maneira geral, eles são atribuídos a uma relação entre fatores ambientais, características do hospedeiro e a fatores genéticos do patógeno .

Dormans e colaboradores demonstraram que infecções por diferentes linhagens de *M. tuberculosis* podem apresentar diferentes cursos de infecção, resposta imune do hospedeiro e virulência. Contudo, existem evidências de que uma predisposição genética multifatorial, além de fatores como idade, estado imunológico do indivíduo, doenças concomitantes e outros fatores de resistência do hospedeiro estejam associados .

Em alguns indivíduos saudáveis, expostos a *M. tuberculosis*, nenhum sinal de infecção, como patologia, sintomas e resposta imune adaptativa aparente, são detectados. É possível que nestes casos, a resposta imune inata tenha eliminado o patógeno nos estágios primários do contato entre patógeno e hospedeiro .

Mais comumente, a ingestão da bactéria por uma APC pode rapidamente induzir uma resposta inflamatória. Citocinas e quimiocinas desencadeiam a proliferação rápida de uma variedade de células do sistema imune que, com o tempo, resultam na formação de um granuloma, caracterizado por fagócitos infectados circundados por monócitos e macrófagos ativados, e posteriormente, linfócitos ativados .

Se a infecção é contida com sucesso até este estágio, o granuloma regride e pode eventualmente desaparecer, deixando uma pequena cicatriz ou calcificação, e as células T do indivíduo tornam-se responsivas para antígenos derivados do *M. tuberculosis*. Caso a resposta imune não for eficiente para o controle da replicação bacteriana, o granuloma aumenta em tamanho e celularidade. Eventualmente, as células morrem no granuloma levando a uma necrose. Neste caso, se o granuloma localiza-se perto à interface do pulmão, a destruição tecidual causada pela necrose pode violar esta mucosa e ocorrer o extravasamento do granuloma no lúmen pulmonar, processo chamado de cavitação. Tal estágio da infecção gera os sintomas característicos da TB, ou seja, tosse persistente com sangue e escarro. Neste ponto, o paciente é altamente infectante, expelindo a bactéria por aerossol .

1.3 Epidemiologia da Tuberculose no Brasil e no mundo

Apesar de ser uma doença curável e da existência de uma vacina, a TB ainda é um sério problema de saúde pública no mundo e consiste em uma das principais causas de morte por doença infecciosa . A alta prevalência de TB é presumida ser principalmente o resultado de condições sanitárias precárias, epidemia do HIV, além de inadequado diagnóstico e tratamento .

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com *M. tuberculosis*, resultando em 1,3 milhões de mortes anualmente. Aproximadamente 95% dos casos de TB ocorrem em países em desenvolvimento, sendo que 22 países concentram 80% do total de casos. O Brasil está entre os principais países que registram esses casos, ocupando a 19ª posição, atingindo todas as faixas etárias. Em 2007, o Brasil registrou uma incidência de 38/100.000 habitantes em todas as formas de TB resultando em uma prevalência de 60 casos por 100.000 habitantes . A distribuição dos casos no Brasil está concentrada em 315 dos 5564 municípios do país, correspondendo a 70% da totalidade destes. A taxa de incidência por região varia de aproximadamente 30 casos/100.000 habitantes nas regiões Sul e Centro-Oeste, e aproximadamente 50 casos/100.000 habitantes nas regiões norte, nordeste e sudeste do país . O Estado de Goiás apresenta uma incidência anual de aproximadamente 14,6 casos a cada 100.000 habitantes .

1.4 Estratégias de controle e tratamento para tuberculose

Apesar da TB ser uma das doenças mais antigas do mundo e de existir uma vacina, programas de prevenção e controle além de tratamento eficaz, ela ainda persiste como a maior causa de morbidade e mortalidade, afetando quase um terço da população mundial, sendo um dos maiores problemas de saúde pública do mundo no século XXI .

1.4.1 Políticas de controle

Em 1993 a OMS (Organização Mundial de Saúde) decretou a TB como uma emergência mundial de calamidade pública. Desde então, ela vem sendo prioridade para o desenvolvimento de várias metas globais e indicadores para o seu controle a fim de se observar uma substancial melhora e diminuição dos índices de TB. Foram consideradas metas de impacto reduzir, até o ano de 2015, a incidência para 25,9/100.000 habitantes e a taxa de prevalência e de mortalidade à metade em relação a 1990. Além disso, espera-se que até 2050 a incidência global de TB ativa seja menor que 1/1.000.000 habitantes por ano).

Dessa forma, as estratégias DOTS (*Directly Observed Therapy Short-Course*) foram recomendadas pela OMS como resposta global para o controle da doença. Esta estratégia pode ser entendida como um conjunto de boas práticas para o controle da TB e fundamenta-se em cinco componentes :

- 1- Compromisso político com fortalecimento de recursos humanos e garantia de recursos financeiros, elaboração de planos de ação (com definição de atividades, metas, prazos e responsabilidades) e mobilização social;
- 2- Diagnóstico de casos por meio de exames bacteriológicos de alta qualidade;
- 3- Tratamento padronizado com a supervisão da tomada da medicação e apoio ao paciente;
- 4- Fornecimento e gestão eficaz de medicamentos;
- 5- Sistema de monitoramento e avaliação ágil que possibilite o acompanhamento dos casos, desde a notificação até o encerramento do caso;

As estratégias DOTS são políticas prioritárias para o controle da TB, principalmente para os 22 países responsáveis por 80% do total de casos notificados no mundo . Apesar de o Brasil continuar fazendo parte deste grupo, em 2007 foi constatado um decréscimo de 26% na incidência e 32% na mortalidade vinculados à TB no país. Esta diminuição vem acentuando-se desde a implementação destas estratégias neste país, entre 1998 e 1999 . Estas estratégias, gerenciadas pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNC-TB), foram introduzidas gradativamente nos municípios, e em 2007 atingiram uma cobertura de 75%, alcançando 72% de sucesso no tratamento dos pacientes .

Adicionalmente, em 2006, a estratégia STOP-TB/OMS foi lançada visando o alcance das metas globais . Esta estratégia apresenta cinco principais componentes, sendo que a estratégia DOTS continua sendo central. São eles:

- 1- Buscar a expansão e o aperfeiçoamento da qualidade das estratégias DOTS;
- 2- Tratar a co-infecção TB/HIV, TB-MDR e outros desafios;
- 3 – Contribuir para o fortalecimento do Sistema de Saúde;
- 4- Envolver todos os provedores da saúde;
- 5 – Capacitar e Promover a pesquisa nas mais diversas áreas (vacina, medicamentos entre outros).

1.4.2 Vacinação

O Bacilo Calmette-Guerin (BCG) é uma linhagem de *M. bovis* que foi atenuada entre 1906 e 1920 com mais de 200 passagens em meio bile-batata glicerinado. Subseqüentes estudos inoculando BCG em ratos, *guinea pigs*, bovinos, macacos *rhesus* e chimpanzés demonstraram infectividade, imunogenicidade, porém completa atenuação da linhagem. Durante estas passagens *in vitro*, o BCG submeteu-se a perdas e/ou rearranjos em diversos complexos gênicos que somente têm sido identificados recentemente .

O BCG tem sido utilizado como vacina desde 1921 e em 1928 foi recomendada pela Liga das Nações Unidas como vacina oficial contra TB humana. Atualmente, a BCG é a vacina mais utilizada no mundo, e

é recomendada pela OMS para todas as crianças abaixo de um ano de idade. Anualmente, 100 milhões de recém-nascidos recebem esta vacina estimando-se uma cobertura vacinal global de 80% (3 bilhões de indivíduos são vacinados com BCG) (Lugosi 1992).

A BCG oferece vantagens únicas como vacina: 1- não é afetada pelos anticorpos maternos e, portanto, pode ser administrada em recém-nascidos; 2- é usualmente dada em uma única dose; 3- é estável, barata e segura; 4- pode ser administrada oralmente . Contudo, apesar de inúmeras vantagens e da grande cobertura vacinal, têm-se confirmado que a eficácia de proteção da BCG pode variar consideravelmente de 0 a 80% em diferentes populações .

Vários fatores têm sido numerados como justificativa para tamanha heterogeneidade como: variabilidade na preparação da vacina em diferentes laboratórios, variabilidade da linhagem de BCG utilizada na atenuação, fatores ambientais e, diferenças genéticas e nutricionais entre diversas populações podem ser consideradas como interferentes .

Apesar desta alta variabilidade na eficácia de proteção, é mundialmente aceito que a BCG protege contra manifestações graves da infecção primária com o *M. tuberculosis*, como as formas hematogênicas de disseminação e meningoencefalite, além de proteger crianças contra TB, mas que esta imunidade pode declinar com a idade, resultando em falência ou ineficiência na proteção contra TB pulmonar em adultos .

1.4.3 Terapia antimicrobiana

A história da TB é drasticamente mudada após a introdução de agentes antimicrobianos. O tratamento com drogas é fundamental para o controle da doença, promovendo a cura dos pacientes e a interrupção das cadeias de transmissão quando o esquema terapêutico é completamente e corretamente seguido .

O tratamento com drogas anti-TB iniciou-se em 1944, quando a estreptomicina (S) e o ácido para-aminosalicílico (PAS) foram descobertos. Em 1950, o primeiro estudo, comparando a eficácia da S e PAS como monoterapia ou combinados foi realizado, demonstrando que a terapia combinada foi mais efetiva, resultando no primeiro tratamento multi droga anti-TB. Em 1952, a isoniazida (H) foi adicionada como uma terceira droga, aumentando consideravelmente a eficiência do tratamento, mas este precisava ser administrado por 18-24 meses, período demasiadamente longo. Em 1960, o etambutol (E) entrou na quimioterapia substituindo o PAS, e o período de tratamento pôde ser reduzido para 18 meses. Nos anos 70, a rifampicina (R) foi inserida em combinação às outras drogas já existentes e o período de duração foi diminuído para 9 meses. Finalmente em 1980 a pirazinamida (Z) foi introduzida no tratamento anti-TB o qual foi reduzido para 6 meses, e é utilizado até os dias atuais, denominada terapia de curto período .

Drogas para o tratamento da tuberculose são usualmente classificadas como drogas de primeira e segunda linha. Tradicionalmente existem cinco drogas de primeira linha: H, R, Z, E e S. Quando estas não são efetivas o suficiente para eliminar os bacilos, principalmente em casos em que esses apresentam resistência, o tratamento é realizado com drogas de segunda linha que incluem: os aminoglicosídeos canamicina e amicacina, os polipeptídeos capreomicina, PAS e cicloserina, e as tioamidas etionamida e protionamida, além de diversas fluoroquinolonas como a moxifloxacina, levofloxacina e gatifloxacina .

Diversas combinações de drogas são recomendadas em todo o mundo, dependendo de muitos fatores, como a localização e severidade da doença, co-infecção com HIV, endemicidade do país, drogas avaliáveis, custo do tratamento, supervisão médica, casos novos ou re-tratados bem como fatores econômicos do país. No Brasil o Ministério da Saúde estabelecia quatro categorias de diagnóstico da TB e tais categorias eram utilizadas para a definição do tratamento como mostrado na tabela 1.

Tabela 1- Esquema de tratamento para tuberculose utilizado no Brasil .

Diagnóstico	Esquema de tratamento (M=meses)
Esquema I: casos novos de todas as formas (exceto meningoencefalite)	2M (R+H+Z) / 4M (R+H)
Esquema IR: recorrência e re-tratamento devido a não aderência	2M (R+H+Z+E)/ 4M (R+H+E)
Esquema II: Meningite tuberculosa	2M (R+H+Z+E) / 7M (R+H)
Esquema III: Falência do esquema I, IR e II	3M (S+Et*+E+Z) / 9M (Et+E)

R=Rifampicina; H=Isoniazida; Z=Pirazinamida; E=Etambutol; S=Estreptomicina; Et=Etionamida

Atualmente, o referido esquema está sendo alterado substancialmente, introduzindo o 4º fármaco (E) na fase de ataque do esquema I e este passa a ser destinado aos casos novos e recidivantes, eliminando dessa forma os esquemas IR e III utilizados anteriormente. Esta alteração justifica-se, entre outras razões, pelo aumento da resistência à H, observada em dois inquéritos nacionais, realizados em 1995/97 e 2007/2008. Adicionalmente, para os casos de meningoencefalite, adiciona-se a administração de um corticoesteróide, e nos casos de MDR-TB passam a ser administrados os fármacos de segunda linha levofloxacina (L) e terizidona (T) (tabela 2) .

Tabela 2- Esquema atualizado de tratamento para tuberculose utilizado no Brasil

Diagnóstico	Esquema de tratamento (M=meses)
Esquema básico: Casos novos e re-tratados de todas as formas (exceto meningoencefalite).	2M (R+H+Z+E) / 4M (R+H)
Esquema para meningite tuberculosa	2M (R+H+Z+E) / 7M (R+H) + corticóide
Esquema para MDR-TB: Falência do esquema I	6M (S+E+Z+L+T) / 12M (L+T +E)

R=Rifampicina; H=Isoniazida; Z=Pirazinamida; E=Etambutol; S=Estreptomicina; L=Levofloxacina; T=Terizidona

A necessidade da utilização de uma terapia combinada pode ser explicada porque o tratamento da TB ativa com uma única droga leva à seleção de bacilos resistentes resultando na falência do tratamento. Adicionalmente, em uma população micobacteriana, existe uma heterogeneidade de sub-populações de bacilos, e cada uma delas pode apresentar distintos perfis de susceptibilidade para drogas anti-TB .

Dessa forma, o corrente tratamento de curto período para a completa eliminação de bacilos é composto por basicamente duas fases com dois objetivos principais. A primeira fase, denominada de ataque, visa a rápida eliminação dos bacilos extracelulares presentes nas cavidades pulmonares, os quais estão metabolicamente ativos e em constante divisão, a fim de diminuir a carga bacilar a ponto de não ser detectável mais na baciloscopia e consequentemente impedir a transmissão da doença. Posteriormente tem-se a fase de manutenção, que tem como objetivo alcançar a esterilização e eliminação completa dos bacilos com menor atividade replicativa nas lesões, bem como eliminar os bacilos dormentes, que residem intracelularmente em outros tecidos do hospedeiro. Esta eliminação é extremamente importante a fim de se evitar subseqüentes reativações de TB .

Contudo, apenas a combinação de terapia em pacientes infectados com linhagens de *M. tuberculosis* susceptíveis aos antimicrobianos não garante efetivamente a emergência de linhagens resistentes a drogas, especialmente se os pacientes não aderirem adequadamente ao tratamento . Diante da gravidade das consequências da falência no tratamento da TB e o risco do surgimento de cepas resistentes, a OMS criou as estratégias DOTS anteriormente mencionadas, que tem como um dos principais objetivos a observação direta da ingestão de medicamentos para TB em pelo menos três observações semanais, nos primeiros dois meses, e uma observação por semana, até o seu final .

1.5 Bases moleculares da resistência às drogas da TB

Tratando-se de TB, resistência a drogas não é um fenômeno recente. A monoterapia para tuberculose, resultando em emergência de linhagens resistentes a drogas foi notada desde 1944, quando a S foi introduzida no tratamento para a doença. O PAS e posteriormente a H foram incorporados ao regime de tratamento para prevenir o desenvolvimento de resistência a S .

Elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, comumente envolvidos com transferência de genes de resistência em muitas bactérias, não têm sido associados com resistência à TB . A aquisição de resistência pelas micobactérias é um evento randômico resultante de mutações cromossomais espontâneas. Dada uma população micobacteriana, 1 em cada 10^6 bactérias é mutante para resistência a H, enquanto 1 em cada 10^8 apresentam mutação para o desenvolvimento de resistência a R .

Drogas anti-TB impõem uma pressão seletiva na população de *M. tuberculosis* nos quais mutantes resistentes podem aumentar gradualmente sua proporção em relação aos sensíveis e emergirem como linhagem dominante. Dessa forma, uma aquisição sequencial de resistência devido a mutações em diversos genes pode ocorrer em consequência a diversos fatores, como por exemplo: devido à monoterapia; devido à administração ou prescrição médica irregular das drogas; aderência incompleta ao tratamento; e diagnóstico impróprio, o que pode resultar em linhagens multi-droga resistentes (MDR-TB) . Uma vez que bacilos resistentes emergem durante o tratamento, chamada de resistência adquirida, estes podem ser transmitidos para a comunidade e aqueles indivíduos infectados com estas linhagens, são considerados resistentes primários

De acordo com a OMS, para ser considerada MDR-TB, a linhagem de *M. tuberculosis* deve ser resistente a no mínimo H e R, as duas principais drogas utilizadas no tratamento da TB . No Brasil considerava-se MDR-TB aquelas linhagens resistentes a H, R e mais uma droga de primeira linha utilizada no tratamento da TB . Isso se deve ao fato de o Brasil adotar até recentemente esquemas adicionais (esquema IR e III; tabela 1) para os casos de falência do esquema I e II. Com a introdução do quarto fármaco já no esquema básico, tal conceito passa a ser igual ao da OMS. Linhagens consideradas MDR-TB requerem tratamento com drogas de segunda linha que têm limitada eficácia, maior toxicidade e custos .

No entanto, nas últimas décadas, o uso indevido destas novas drogas com ação anti TB, em particular as fluoroquinolonas (FQs), que são as drogas mais eficazes entre os medicamentos de segunda linha, tem levado a um aumento do espectro da resistência para TB, originando cepas designadas extensivamente resistentes (*extensively drug-resistant TB*; XDR-TB). Estas linhagens são definidas como MDR-TB com adicional resistência a FQs e a no mínimo uma droga de segunda linha injetável .

O número de casos de linhagens resistentes, em particular MDR-TB, vem crescendo a cada dia e é uma grande preocupação na pandemia de resistência a antimicrobianos. Primeiro, porque os pacientes podem permanecer infectados durante meses ou anos com alto risco de transmissibilidade para a comunidade e morte dos pacientes, segundo porque há um alto risco de agravamento e progressão para XDR-TB.

1.5.1 Mecanismos de ação e resistência das drogas utilizadas no tratamento da tuberculose

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado a emergência de certas linhagens de *M. tuberculosis*, como as famílias Beijing/W e Haarlem, que induzem formas mais graves da TB, geralmente associadas à maior dispersão e resistência às drogas (Marais et al. 2006; Dalla Costa et al. 2009; Li et al. 2010). A ocorrência destas linhagens em países desenvolvidos enfatiza a disseminação global da TB mesmo em países com bons programas de controle da doença, aumentando, dessa forma, as dificuldades de eliminação da doença. Dessa forma, o entendimento das bases moleculares que conferem resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento da TB faz-se necessário visto que atualmente tem-se um constante aumento na frequência e disseminação dessas linhagens resistentes.

1.5.1.1 Isoniazida (H)

A isoniazida é uma pró-droga que necessita ser metabolizada em ácido isonicotínico pela enzima micobacteriana catalase peroxidase (*katG*), codificada pelo gene *katG*. O modo de ação da H tem sido objeto de intensos estudos, mas é conhecido por gerar uma série de compostos altamente reativos, incluindo espécies reativas do oxigênio (ROS) tais como superóxidos, peróxidos e radicais hidroxila (Shoeb et al. 1985), óxido nítrico (Timmins et al. 2004), espécies orgânicas reativas tais como o radical acil-isonicotínico (Rawat et al. 2003), e certas espécies eletrofílicas (Johnsson et al. 1995), que, em seguida, atacam múltiplos alvos de *M. tuberculosis*. Este ataque resulta em efeitos pleiotrópicos, como inibição da síntese proteica e de ácidos nucleicos (Tsukamura & Tsukamura 1963; Santos et al. 2010).

Adicionalmente, a H inibe a InhA, uma adenina nicotinamida dinucleotídeo específica (NADH) que transporta proteínas acil-enoil redutase (ACP) envolvidas na síntese de ácidos graxos, resultando na perda da álcool-ácido resistência, provavelmente, como resultado da inibição da síntese de ácidos micólicos (Takayama et al. 1972; Global 2008a). No entanto, apesar desse progresso sobre a compreensão da ação da H, o exato mecanismo (s) contra o *M. tuberculosis* continua a ser esclarecido, visto que há vários alvos e vias metabólicas a serem considerados (Figura 2) (Timmins et al. 2004).

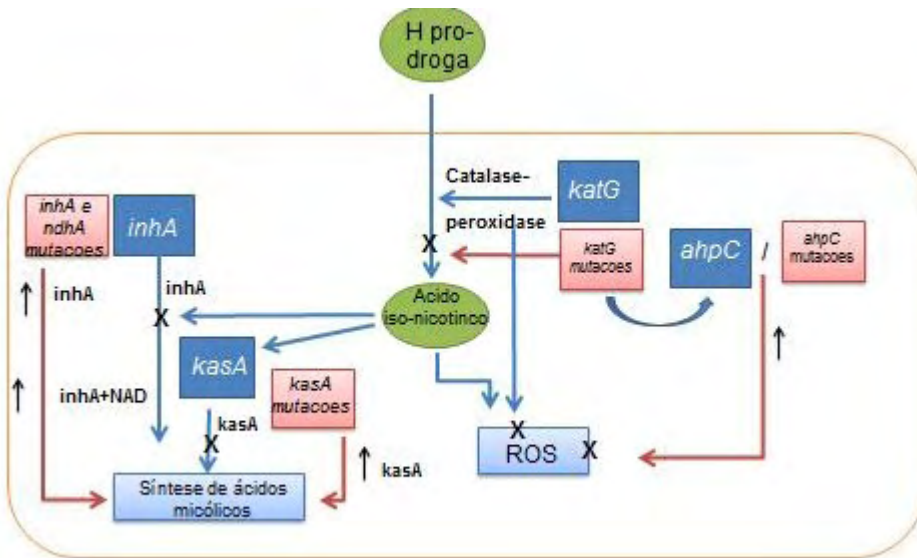


Figura 2- Mecanismo de ação da isoniazida e aquisição de resistência.

A H é a droga de primeira linha anti-TB mais utilizada, e tem sido o principal fármaco de todos os esquemas efetivos para o tratamento da doença ativa e latente. O *M. tuberculosis* é altamente susceptível a H (concentração inibitória mínima [MIC] 0.02-0.2µg/ml) com forte atividade bactericida precoce contra bacilos em crescimento (Zhang & Yew 2009). A H é o fármaco com maior capacidade de impedir o surgimento de resistência bacilar para as demais drogas administradas no esquemas terapeuticos da TB, mas geralmente é a primeira droga dentre essas a qual os bacilos tornam-se resistentes (Yoshiyama et al. 2004). Dessa forma, a resistência à H é a forma de resistência mais comumente encontrada, seja isoladamente ou em combinação com outras drogas (WHO 2008).

Contudo, existem muitos pontos inexplicados sobre os mecanismos de ação desta sob o *M. tuberculosis*. Estima-se que cerca de 10- 25% das linhagens H-resistentes não possuem alterações genéticas nos genes conhecidos. Porém, sabe-se que a maior parte da resistência à H é controlada por um complexo sistema genético que envolve genes como *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA* e *ndh* (Valcheva et al. 2008; Santos et al. 2010). No entanto, mutações em pelo menos 16 outros genes foram relatados por estarem associados à resistência à H em isolados clínicos (Ramaswamy et al. 2003).

Estima-se que 40 a 95% dos isolados clínicos H-resistentes resultam do bloqueio da ativação da pró-droga, através de alterações no gene *katG*, que levam à diminuição ou alteração da atividade da *katG* micobacteriana, resultando em altos níveis de resistência à H. A maioria destas mutações são encontradas em uma região do gene *katG* que compreende os códons 138 a 328, sendo alterações no códon 315 as mais comumente observadas (frequência de 75 a 90%) (Hazbon et al. 2006). A região do genoma em que se encontra o gene *katG* parece ser relativamente instável e, portanto, susceptível as alterações acima referidas, possivelmente devido à presença de sequências de DNA repetitivos. Essa instabilidade pode

contribuir para as taxas relativamente altas de geração de mutantes H-resistentes, normalmente citado como sendo 1 em 10^{5-6} organismos durante a seleção *in vitro* (Slayden & Barry, 2000).

Entre 53 e 96% dos isolados resistentes à H apresentam uma substituição em um único nucleotídeo, na posição 315 do gene *katG* (S315T). Adicionalmente, isolados da família Beijing/W de vários países têm uma maior frequência de alterações no referido códon, comparados aos isolados não pertencentes à essa família (Mokrousov et al. 2002; Park et al. 2005; Lipin et al. 2007; Li et al. 2010). Esta mutação pode ser favorecida porque elas parecem diminuir a ativação do fármaco, sem abolir a atividade da enzima *katG* e, portanto, sem diminuir a virulência ou transmissibilidade das cepas de *M. tuberculosis* (Dalla Costa et al. 2009).

Embora a mutação S315T seja a mais comum, alterações genéticas no sítio ativo da enzimas catalase-peroxidase, bem como o local de ligação do cofator heme, também resultam na redução da função enzimática e, portanto, resistência à H (Finzel et al. 1984). As alterações nos códons V33Stop, D65E, D94A, G99E, H108E, N138S / H, S140A/N, D142A, L150A, S160L, A172T, T180C, V200Stop, F252L, T262R, P275T, Q294Stop, W299G, W328G, I335T e A350S, do gene *katG* também têm sido associadas com altos níveis de resistência ao fármaco (Heym et al. 1999).

O *M. tuberculosis* pode compensar mutações no gene *katG*, que resultam na diminuição ou bloqueio da função exercida pela *katG*, pela superexpressão do gene *ahpC*, que codifica uma alquil-hidroperóxido redutase (*ahpC*), proteína envolvida na regulação do estresse oxidativo celular, capaz de reverter os danos gerados por peróxidos orgânicos (Sherman et al. 1996; Dalla Costa et al. 2009). Contudo, alterações em cinco diferentes códons [-48 (G → A), -51 (G → A), -54 (T → C), - 74 (G → A) (C → T) e -81 (C → T)] que levam à superexpressão da proteína têm sido identificadas na região promotora do gene *ahpC* em isolados resistentes à H (Telenti et al. 1997a). Adicionalmente, mutações na região intergênica *oxyR-ahpC*, também resultam no aumento da expressão da *ahpC*, podendo compensar a sensibilidade aos peróxidos devido à perda da função da enzima *katG* (Ramaswamy & Musser 1998; Zhang et al. 2005). No entanto, a correlação entre os sítios polimórficos na região *oxyR-ahpC* com a resistência à H em *M. tuberculosis* requer uma análise mais detalhada.

A resistência à H pode ainda ser resultado de alterações ou superexpressão do alvo do fármaco, a proteína *InhA*, cujo gene está inserido em um operon formado pelos genes *inhA* e *mabA*. O gene *inhA* (ORF) codifica uma proteína transportadora acil enoil redutase, que ao se ligar ao NADH, formando o complexo *InhA-NADH*, desempenha um papel na síntese de ácidos micólicos. O derivado tóxico da H inibe diretamente a proteína *InhA* impedindo a formação do complexo, resultando na inibição da biossíntese dos ácidos micólicos (Basso & Blanchard 1998).

Estima-se que mutações na referida região do gene *inhA* (ORF), totalizando seis alterações diferentes (I16T, I21T, I21V, I47T, V78A e I95P), estão presentes em apenas 0 a 5% dos isolados clínicos de *M.*

tuberculosis resistentes à H (Ramaswamy & Musser 1998; Johnson et al 2006). A maior parte das mutações relacionadas à esse gene (8 a 20%), localizam-se na região promotora, nas posições -24 (G→T), -16 (A→G), -8 (T→G/A) e -15 (T→C) (Johnson et al. 2006). Esta região regula a expressão da *inhA*, e tais mutações resultam no aumento dos níveis de expressão dessa proteína (Banerjee et al. 1994; Hazbon et al 2006; Johnson et al 2006; Dalla Costa et al 2009), que leva à baixos níveis de resistência à H e é acompanhada por resistência cruzada à Et, devido à suas semelhanças estruturais (Dessen et al. 1995).

Foram encontrados em uma menor frequência, dois outros genes envolvidos na resistência à H, o *kasA* e *ndh*. O primeiro, codifica uma proteína β -cetoacil-ACP sintase (*kasA*) envolvida na síntese de ácidos meromicólicos (Mdluli et al. 1998) e sua superexpressão leva à resistência à H em uma MIC de 0.1 μ g/ml (Slayden & Barry 2002). Análises do gene *kasA* revelam quatro diferentes substituições envolvendo os códons: 66 (GAT → AAT), 121 (AGG → AAG), 269 (GGT → AGT), 312 (GGC → AGC), 387 (GGC → GAG) e 413 (TTC → TTA) (Mdluli et al 1998; Lee et al, 1999). Embora mutações semelhantes também sejam encontradas em isolados sensíveis à H (Piatek et al. 2000), a possibilidade de *kasA* constituir um mecanismo adicional de resistência não deve ser excluída (Johnson et al. 2006).

Mutações no gene *ndh*, que codifica uma NADH dehidrogenase envolvida na formação de um complexo juntamente com a *inhA*, foram relacionadas a resistência à H e Et em *M. bovis* (Lee et al. 2001). Tais mutações alteram os níveis de proporção NADH/NAD, causando defeitos na atividade enzimática. Isso ocorre porque defeitos na oxidação de NADH para NAD resultam no acúmulo do primeiro e depleção do NAD (Lee et al. 2001). Estes altos níveis de NADH podem dificultar a ligação NAD-H, o sítio ativo da droga (Lee et al. 2001; Vilcheze et al. 2005; Hazbon et al. 2006). Cerca de 9,5% das amostras resistentes à H apresentem mutações nos códons 110 e 168 do gene *ndh* e tais mutações não foram detectadas em amostras sensíveis à H (Lee et al. 2001).

Estudos de mutações associadas à resistência à H têm sido limitados devido à variedade de genes envolvidos, o número de isolados analisados, e a ausência de correlação com os níveis de H *in vitro*, determinada pela concentração inibitória mínima. Dalla Costa e colaboradores (2009) caracterizaram mutações nos genes *katG*, *ahpC* e *inhA* (ORF e região reguladora) de 224 isolados de *M. tuberculosis* resistentes à H em países da América do Sul. Entre esses, mutações no gene *katG* foram as mais frequentes (80,8%, 181/224), sendo que as localizadas no códon 315 estavam presentes em 178 isolados. Tais taxas foram proporcionais às previamente relatados no Kuwait, no Brasil e na Holanda (65%, 60% e 55%, respectivamente), mas inferior às descritas na Rússia (Silva et al. 2003; Ahmad & Mokaddas 2004; van Doorn et al. 2006; Lipin et al 2007). Após as mutações no gene *katG*, mutações na região reguladora *inhA* foram as mais frequentes (9,8%), seguidas pelo gene *ahpC* (8,9%) e região ORF do *inhA* (1,3%).

1.5.1.2 Rifampicina (R)

A RNA polimerase (RNAP) é uma importante enzima envolvida no processo de transcrição e é o alvo final para as vias que regulam a expressão do gene em todos os organismos vivos. Nas bactérias, a RNAP é responsável pela síntese de mRNA, rRNA e tRNA (Borukhov & Nudler 2003). O núcleo enzimático de 400 KDa da RNAP é composto por cinco subunidades diferentes, incluindo um dímero α (α_2), subunidade β , subunidade β' e subunidade ω . Estas subunidades são convertidas em uma holoenzima seguidas de ligação à subunidade σ , que inicia a transcrição dos promotores (Jin & Gross et al. 1989). Os genes que codificam as subunidades α , β , β' , ω e σ foram designados *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoZ* e *rpoD*, respectivamente (Jin & Gross 1989; Minakhin et al. 2001).

A R foi introduzida na terapia anti-TB no início de 1970 e desde então é um dos medicamentos de primeira linha mais importantes para o tratamento da TB. A R é uma droga bactericida que atua inibindo a subunidade β da RNAP de bactérias, mas não de mamíferos, atuando no início da transcrição. Acredita-se que a R se liga à subunidade β , perto do canal RNA/DNA, e bloqueia fisicamente o alongamento da cadeia de RNA a ser sintetizada, após a adição de 2-3 nucleotídeos. Em *M. tuberculosis* a ação bactericida do referido fármaco tem sido associada à indução de apoptose através da ativação do "gene suicida" *mazEF* (Global 2008b).

A R é uma das drogas mais efetivas utilizadas no tratamento da TB, apresentando efeitos bactericidas contra bacilos em crescimento e latentes, com baixa atividade metabólica, com MICs variando de 0,05 a 1 $\mu\text{g/ml}$ em meio sólido ou líquido. As cepas com MICs $< 1\mu\text{g/ml}$ em meio líquido ou em ágar ou MICs $< 40\mu\text{g/ml}$ em Lowenstein-Jensen (LJ), são consideradas sensíveis à R (Mitchison 1985).

A resistência à R ocorre em uma frequência relativamente baixa, 10^{-7} a 10^{-8} , por isso monoresistência devido à essa droga em *M. tuberculosis* é rara, exceto em pacientes infectados pelo HIV (Traore et al. 2000). Uma vez que monoresistência à H é mais comum, estima-se que 90% dos isolados que apresentam resistência à R também são resistentes à H, dessa forma, resistência a essa droga é considerada marcador para MDR-TB (Ramaswamy & Musser 1998).

Vários estudos têm demonstrado que isolados de *M. tuberculosis* R-resistentes apresentam uma série de mutações ou pequenas deleções em uma pequena região do gene *rpoB*. Desde 1993, quando Telenti e colaboradores (1993b) clonaram e sequenciaram tal região, um grande número de mutações têm sido relatados a partir de linhagens isoladas em vários países do mundo (Matsiota- Bernard et al. 1998; Pozzi et al. 1999; Yuen et al. 1999; Valim et al. 2000; Heep et al. 2001). Como ocorre em outras bactérias, alterações em uma região "hot-spot" de 81 pares de base (pb) do gene *rpoB* (códon 432-458 no *M. tuberculosis* e 507-533 em *Escherichia coli*, denominado cluster I), chamada de Região Determinante de Resistência à Rifampicina (RRDR- rifampicin-resistance determining region), são encontrados em 94-98% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes a R (Hillemann et al 2005; Santos et al 2010).

Aproximadamente 69 alterações pontuais, três inserções, 16 deleções e 38 diferentes substituições nucleotídicas foram relatadas na região (Herrera et al. 2003). Contudo, Herrera et al. (2003) e outros autores (Matsiota-Bernard et al. 1998; Pozzi et al. 1999; Yuen et al. 1999) detectaram mutações associadas à resistência à R fora do cluster I, tais como nos códons: 481, 490, 498, 505, 534, 535, 553, 561, 571, 572, 633 e 672, embora essas ocorram com uma menor frequência.

Mutações nos códon 513 ao 531 do gene *rpoB*, tanto em isolados clínicos quanto laboratoriais, geralmente resultam em altos níveis de resistência (MIC[>]32µg/ml) (Telenti et al. 1993a; Williams et al. 1998; Global 2008b). Sendo mutações nas posições 531, 526 e 516 as mais frequentemente encontradas (Williams et al. 1998). Siddiqi e colaboradores (2002), analisaram 93 linhagens R-resistentes isoladas na Índia, destas, as alterações mais frequentes estavam localizadas no códon 531, sendo 28 isolados apresentando mutações missense do tipo Ser531Leu e oito, a substituição Ser531Trp. Em seguida, as substituições dos aminoácidos Asp516Val ou Asp516Gly foram as mais frequentes, totalizando 20 isolados e His526Tyr, His526Leu ou His526Arg, 19 isolados. De acordo com este estudo, os aminoácidos 526-531 parecem ser importantes nas interações com o alvo da droga resultando em MICs superiores a 64µg/ml.

Contudo, de acordo com a localização geográfica ou o tipo de população de estudo, a natureza e a frequência de mutações no gene *rpoB* entre as linhagens de *M. tuberculosis* R-resistentes podem variar consideravelmente (Kapur et al. 1995; Morris et al. 1995; Ahmad et al. 2000). Kapur e colaboradores (1994) examinaram uma coleção de linhagens dos EUA e encontraram a alteração do tipo CAC → TAC no códon 526 (His→Tyr) em 30% dos isolados, enquanto que esta mutação representava apenas 12% dos isolados de nove países estudados por Telenti et al. (1993a). Adicionalmente, já foi demonstrado que mutações no códon 533 têm sido reportadas para linhagens resistentes e sensíveis à R (Taniguchi et al. 1996), no entanto, em estudos conduzidos com isolados no Brasil e na França, esta mutação estava fortemente relacionada com resistência à R (Spindola de Miranda et al. 2001).

1.5.1.3 Pirazinamida (Z)

A Z é uma importante droga de primeira linha que desempenha um papel essencial no tratamento da TB. Seu efeito bactericida é voltado principalmente à população de bacilos latentes, no ambiente ácido das lesões, onde outras drogas não apresentam boa atividade (Mitchison 1985). A Z tem alta atividade esterilizante *in vivo* em ambientes ácidos (pH=5.5) (Zhang et al. 2003), mas nenhuma atividade contra bacilos em condições normais, como por exemplo, no pH de culturas *in vitro*, próximo ao neutro (Zhang & Yew 2009). Mesmo em pH ácido, a atividade da Z varia com MICs na faixa de 6,25-50µg/ml, porém esta atividade é reforçada em baixas tensões de oxigênio ou condições anaeróbias (Wade et al. 2004), por

agentes que comprometem o status energético celular, tais como ácidos fracos (Wade et al. 2006), e inibidores de energia, como o DCCD (d ciclohexilcarbodiimida) (Zhang et al. 2003).

O mecanismo de ação da Z sob o *M. tuberculosis* ainda é mal compreendido, sabe-se que ela é uma pró-droga que penetra no microrganismo e requer a conversão em sua forma ativa, o ácido pirazinóico (POA), pela enzima pirazinamidase/ nicotinamidase (PZAse), codificada pelo gene *pncA* (Scorpio & Zhang 1996). Os isolados sensíveis à Z possuem uma PZAse, que é constitutivamente expressa e hidrolisa a droga em POA, uma molécula letal que inibe várias funções em *M. tuberculosis* em pH ácido (Sheen et al. 2009). A POA, produzida intracelularmente, atinge a superfície celular por difusão passiva e defeitos no sistema de efluxo bacteriano (Zhang et al. 1999). O acúmulo de POA e seus protonados reduzem o pH intracelular a níveis abaixo do essencial, e podem inativar muitas vias, incluindo a síntese de ácidos graxos e funções de transporte na membrana (Global 2008c). Adicionalmente, eles trazem prótons a célula e, eventualmente, causam acidificação do citoplasma e desenergizam a membrana, fechando a força motriz de prótons que afetam o transporte desta (Zhang et al. 2003). O alvo da Z está relacionado com o metabolismo energético da membrana, no entanto, é amplamente aceito que seu metabólito ativo pode não ter um alvo específico, mas sim, que a acidificação celular provoca inibição dos principais processos celulares (Global 2008c).

Mutações no gene *pncA*, que resultam na falha da atividade da enzima PZAse, são responsáveis por conferir resistência às linhagens de *M. tuberculosis* (McClatchy et al. 1981; Butler & Kilburn 1983; Sekiguchi et al. 2007). Vários autores têm demonstrado que entre 72% e 95% dos isolados clínicos resistentes à Z apresentam mutações no gene *pncA* e estas mutações geralmente encontram-se agrupadas entre os códons 3-71, 61 -85 e 132-142. Contudo, um pequeno número de mutações podem ocorrer fora do gene, mas estas não foram caracterizadas (Scorpio et al. 1997; Global 2008c). Estudos têm relatado que o alinhamento das sequências de aminoácidos da PZAse de várias espécies, revelam que esta região contém resíduos altamente conservados, apoiando a idéia de que esta região deve ser estrutural e/ou cataliticamente importante para sua atividade (Lemaitre et al 1999; Rodrigues et al. 2005).

1.5.1.4 Etambutol (E)

O etambutol [(+)- 2,2'-(ethilenodiimino) di-1-butanol] é uma das principais drogas alternativas usadas em combinação com a H, R e Z para dificultar o surgimento de resistência entre os bacilos de *M. tuberculosis*. Este fármaco é bacteriostático, ativo contra bacilos em crescimento, não exercendo nenhum efeito sobre os bacilos não-replicantes (Takayama et al. 1989). Embora várias hipóteses tenham sido propostas para explicar seu mecanismo de ação, a maioria dos estudos demonstram uma alteração da

estrutura da parede celular micobacteriana através da inibição da polimerização da arabinana em arabinogalactana e lipoarabinomanana induzindo a acumulação de D-arabinofuranosil-P-decaprenol, um intermediário da biossíntese de arabinana (Sreevatsan et al. 1997; Sekiguchi et al. 2007). A arabinosil transferase, codificada pelo gene *embB*, é uma enzima envolvida na síntese de arabinogalactana, e tem sido proposta como alvo do E nas espécies *M. tuberculosis* e *M. avium* (Belanger et al. 1996).

No *M. tuberculosis*, o gene *embB* é organizado em um operon de 10 kb, juntamente com os genes *embC* e *embA*, chamado *embCAB* (Telenti et al. 1997b) e mutações localizadas neste operon, em particular no gene *embB*, são responsáveis pela resistência ao E. Mutações nesta região resultam em MICs de 7.5-50µg/ml sendo que as localizadas no códon 306 do gene *embB*, chamada de região determinante de resistência ao E (ERDR), são as mais comuns (~68%) (Jain et al. 2008), resultando na substituição de uma metionina por leucina, isoleucina ou valina (Ramaswamy et al. 2000; Global 2008d). No entanto, cerca de 35% das linhagens E-resistentes não têm mutações no gene *embB* (Alcaide et al. 1997), sugerindo a existência de outros mecanismos de resistência.

Estudos realizados por Sreevatsan e colaboradores (1997) comparando linhagens de *M. tuberculosis* E-resistentes versus susceptíveis isoladas de diversas regiões geográficas demonstraram que o operon *embCAB* apresenta restritas variações e que há uma tendência destas, principalmente no códon 306, sugerindo que estes mutantes têm surgido por seleção darwiniana positiva no decurso do tratamento medicamentoso.

1.5.1.5 Estreptomicina (S)

A S é um glicosídeo aminociclitol utilizado como alternativa entre as drogas de primeira linha anti-TB recomendadas pela OMS (WHO, 2008). Ela atua inibindo a síntese proteica e é ativa contra várias espécies bacterianas (Telenti et al. 1993a). A S liga-se à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, interagindo com o RNAr 16S e com a proteína ribossomal S12 (codificada pelos genes *rrs* e *rpsL*, respectivamente) (Abbadi et al. 2001), induzindo mudanças ribossomais, resultando em uma leitura errada do RNAm e inibição da síntese protéica (Davies et al. 1965). A S é bactericida, agindo principalmente contra bacilos em crescimento, com MICs de 2-4 µg/ml (Heifets 2005), mas é inativa contra bacilos latentes ou intracelulares (Mitchison 1985).

A S é o aminoglicosídeo utilizado para o tratamento da TB com menores efeitos tóxicos, porém sua maior desvantagem é a geração rápida de bacilos resistentes (Global 2008e). O *M. tuberculosis* torna-se resistente quando os alvos ribossomais do fármaco são alterados. Mutações pontuais em ambos os genes, *rpsL* e *rrs*, já foram encontradas em isolados S-resistentes, sendo estes, os principais mecanismos

que conferem esta resistência, responsável por 65-67% das linhagens S-resistentes (Finken et al. 1993; Nair et al 1993; Ramaswamy & Musser 1998).

As mutações mais frequentemente observadas no gene *rpsL* localizam-se no códon 43 (AAG→AGG/ACG; Lys→Arg/Thr) e no códon 88 (AAG →AGG/CAG; Lys→Arg/Gln), sendo encontrada em 50% das linhagens resistentes à S (Nair et al. 1993). O *M. tuberculosis* possui apenas uma única cópia do gene *rrs*, que codifica o RNAr 16S e o *loop* formado por este interage com a proteína S12, constituindo um sítio de mutação facilmente selecionado (Finken et al. 1993; Sekiguchi et al. 2007). Geralmente, mutações que conferem resistência à S associadas à esse gene, localizam-se no códon 530, que é o sítio de ligação aminoacil-RNAt e está envolvida no processo de decodificação proteica. Adicionalmente, mutações em uma região adjacente, códon 915 também tem sido associadas (Carter et al. 2000). Cerca de 20% das linhagens S-resistentes apresentam uma transição C→T nas posições 491, 512 ou 516, uma transição A→C/T no códon 513 ou transições na posição altamente conservada do loop, o códon 530 (Ramaswamy & Musser 1998; Carter et al. 2000).

Análises das MICs dos isolados resistentes a S indicam que as substituições de aminoácidos no gene *rpsL* correlacionam-se com altos níveis de resistência, mutações no gene *rrs* correlacionam-se com níveis intermediários (Meier et al. 1996) e alterações na permeabilidade celular ou mutações que estão fora destes genes têm sido relacionadas a baixos níveis (Johnson et al. 2006).

1.5.1.6 Drogas de segunda linha

A quimioterapia de curta duração contendo as drogas R, E e Z permanece eficaz no tratamento de cepas resistentes à H, mas sua eficácia fica substancialmente prejudicada no tratamento da MDR-TB, definida como resistência bacilar a pelo menos H e R, no entanto, MDR-TB não é incurável. De acordo com a OMS, estas linhagens devem ser tratadas com medicamentos de segunda linha, tais como: aminoglicosídeos (canamicina e amicacina), polipeptídeos (viomicina), fluoroquinolonas-FQs (levofloxacina, ofloxacina, ciprofloxacina e gatifloxacina), D-cicloserina e tioamidas (etionamida e protionamida). Infelizmente, essas drogas são mais tóxicas, mais caras e menos eficazes que os fármacos de primeira linha (WHO 2008).

Em março de 2006, a OMS juntamente com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA, publicaram um relatório descrevendo uma forma grave de doença, o XDR-TB (tuberculose extensivamente resistente à drogas) (Prevention 2006). Atualmente, linhagens XDR-TB são definidas como MDR-TB com resistência bacilar adicional a qualquer FQ e pelo menos mais uma droga injetável de segunda linha (Holtz & Cegielski 2007). Os métodos fenotípicos para detecção de resistência a essas

drogas, bem como seus mecanismos moleculares de resistência, ainda não são bem estabelecidas (Johnson et al. 2006).

A levofloxacin (L) e a ofloxacin (O) são as duas principais FQs utilizadas como drogas de segunda linha no tratamento da MDR-TB (WHO 2008). As FQs inibem a DNA girase (topoisomerase II) e a topoisomerase IV, duas enzimas essenciais responsáveis pela manutenção da topologia cromossomal, resultando na morte microbiana (Drlica & Malik 2003). A DNA girase é uma proteína tetramérica composta pelas subunidades A2B2. A subunidade A carrega a região da união com o sítio ativo, enquanto a subunidade B promove a hidrólise do trifosfato de adenosina. No *M. tuberculosis* os genes *gyrA* e *gyrB*, codificam as subunidades A e B, respectivamente, os quais possuem regiões conservadas chamadas de região determinante de resistência às quinolonas (QRDR), com 320 pb e 375 pb, respectivamente. Tais regiões são pontos de interação entre as FQs e a DNA girase (Takiff et al. 1994).

Mutações no gene *gyrA* estão associados à altos níveis de resistência, enquanto mutações no *gyrB* tem sido identificadas apenas em mutantes laboratoriais de *M. tuberculosis* (Sekiguchi et al. 2007). No entanto, entre diferentes estudos, a frequência de isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes às FQs com mutações detectáveis nos genes *gyr* podem variar de 2% a 100% (Lee et al. 2002; Cheng et al. 2004; Wang et al. 2007; Antonova et al. 2008). Essa variação pode ser explicada devido a diferenças na extensão da cobertura de análise do genoma (Takiff et al. 1994); na definição das MICs (Cheng et al. 2004); ou talvez, por outros mecanismos de resistência micobacteriana, tais como a diminuição da permeabilidade da parede celular à droga, bomba de efluxo, sequestro das drogas, ou ainda, falhas em sua ativação (Drlica & Malik 2003; Zhang & Yew 2009).

Um novo mecanismo de resistência às FQs, relacionado com a família de proteínas MfpA que se liga à DNA girase resultando na inibição de sua atividade, foi relatado em *M. tuberculosis* (Hegde et al. 2005). Porém, este mecanismo está relacionado com baixos níveis de resistência, diferentemente daqueles apresentados por mutações nos genes *gyr* (Cheng et al 2004; Zhang & Yew 2009).

A canamicina (Km) e seu derivado amicacina (Am), assim como a S, também são aminoglicosídeos inibidores da síntese proteica por meio da modificação das estruturas ribossomais no RNAr 16S, e por isso, não podem ser usados contra bacilos dormentes (Alangaden et al. 1998). Aminoglicosídeos ligam-se aos ribossomos bacterianos e alteram o alongamento da cadeia peptídica bacteriana (Suzuki et al. 1998). Alterações na subunidade 16S podem resultar em uma resistência cruzada entre as drogas S, Km e Am, porém, algumas linhagens laboratoriais ainda são sensíveis à Km e Am, mesmo quando a resistência à S já tenha se desenvolvido (Global 2008f). Mutações nas posições 1400, 1401 e 1483 do gene *rrs* (16S RNAr) estão associadas com resistência a Km e Am (Suzuki et al. 1998).

A viomicina (V) e a capreomicina (Cm) são polipeptídeos os quais não tem seus modos de ação totalmente esclarecidos, mas sabe-se que inibem a síntese de proteínas procarióticas e, dessa forma, também são utilizadas como medicamentos de segunda linha anti-TB. Como tais drogas têm uma atividade relevante contra formas persistentes de TB, acredita-se que elas podem ter um alvo secundário, fora do ribossomo (Global 2008g). Resistência à Cm e V está relacionada com a RNAr metiltransferase, codificada pelo gene *tlyA* (Maus et al. 2005a). Adicionalmente, mutações no gene *rrs* que codifica o RNAr 16S, especificamente uma alteração G→T no códon 1484, também estão associadas com resistência à V e Cm (Taniguchi et al 1997; Maus et al. 2005b). Resistência cruzada pode ser encontrada entre os fármacos Km, Am, Cm e V (Zhang & Yew 2009).

A Etionamida (Et) é uma importante droga utilizada no tratamento da MDR-TB e é mecanicamente e estruturalmente análoga à H. Como esta, a Et também é um pró-fármaco (Zhang & Yew 2009), no entanto, ela é ativada por um mecanismo que independe da enzima katG. Alguns estudos têm relatado que o gene *ethA* (também chamado *etaA*), que codifica uma flavina mono-oxigenase, é responsável pela ativação da Et, levando à formação de um S-óxido metabólito que tem uma maior atividade quando comparado à droga original (Baulard et al. 2000; Engohang-Ndong et al. 2004; Global 2008h).

O modo de ação da forma ativa da Et é via inibição do produto do gene *inhA*, a enoil-ACP redutase (Banerjee et al. 1994; Johnsson et al. 1995), interrompendo a biossíntese da parede celular por impedir a síntese de ácidos micólicos (Morlock et al. 2003). Mutações na região promotora dos genes *inhA* e *ethA* estão associadas com resistência a Et (Morlock et al. 2003; Engohang-Ndong et al. 2004). Como a enzima responsável pela ativação da Et é diferente da enzima envolvida na ativação da H, apenas os mutantes com alterações no gene *inhA* mostram resistência cruzada entre as drogas H e Et (Baulard et al. 2000).

D-cicloserina (DCS) é um análogo cíclico do aminoácido D-alanina, que é uma das principais moléculas na ligação do peptidoglicano (Ramaswamy & Musser 1998). A DCS inibe a alanina racemase (Alr) e a D-alanina ligase (Ddl), que sintetizam o núcleo do pentapeptídeo usando a D-alanina, essas duas enzimas são essenciais na síntese do peptidoglicano e, conseqüentemente, na biossíntese e manutenção da parede celular (Di Perri & Bonora 2004). A superexpressão de Alr, especialmente, devido a uma transversoão G→T na região promotora do gene *alr*, causam resistência à DCS (Ramaswamy & Musser 1998).

1.5.2 Epidemiologia da resistência a drogas anti-tuberculose

Recentemente, a OMS publicou o quarto relatório global sobre resistência a drogas anti-TB no mundo, relatando os mais recentes dados sobre a extensão da resistência a drogas no período de 2002 e 2007. Este relatório incluiu dados de teste de sensibilidade às drogas de 90.726 amostras de 83 países diferentes.

Entre os novos casos, a média de prevalência de MDR-TB foi de 1,6% (desvio padrão de 0,6-3,9), variando de 0%, em oito países com baixa prevalência de TB, a 19,4% em Moldova e 22,3% em Baku, no Azerbaijão. A prevalência de MDR-TB foi maior que 6% entre os casos novos em 15 localidades, dois destes locais foram províncias da China e 12 concentravam-se em países da ex União Soviética atual Federação Russa. No mínimo um país em todas as seis regiões reportadas pela OMS apresentaram prevalência de pelo menos 3% de MDR ou XDR-TB entre os casos novos.

Entre os casos previamente tratados, a média da prevalência de MDR-TB foi de 11,7% (desvio padrão de 4,9-20,9). Seis países não reportaram casos de MDR-TB entre estes pacientes, enquanto Baku (Azerbaijão) e Tashkent (Uzbequistão) apresentaram 55,8% e 60% respectivamente. De 17 localidades que reportaram prevalência de MDR-TB entre os pacientes com tratamento prévio acima de 25%, nove também pertenciam a países da Federação Russa.

Dados sobre XDR-TB ainda são incompletos no mundo. Somente 37 países ou territórios (a maioria com baixa prevalência de TB) reportaram dados representativos no relatório realizado pela OMS no período de 2002-2007. Um total de 3.818 casos de MDR-TB foi avaliado e destes 304 (8%) foram considerados XDR-TB. Cinco países, todos da ex União Soviética, reportaram 25 casos ou mais cada, com prevalência de XDR-TB entre os casos de MDR variando entre 6,6 e 23,7%.

Em 2010, a OMS publicou uma atualização do último relatório epidemiológico sobre resistência, publicado em 2008, e estimou que aproximadamente 440.000 casos de MDR-TB emergiram globalmente em 2008, totalizando 3,6% dos casos incidentes de TB no mundo e resultando em 150.000 mortes. Quase 50% destes casos de MDR-TB estão concentrados na China e Índia, sendo que apenas o primeiro, contribui com 100.000 casos de MDR-TB anualmente. Contudo, países da Federação Russa, apresentaram heterogeneidade entre os índices de resistência, variando de 5,4% a 28,3% de MDR-TB entre casos novos. Tajiquistão encontrou proporções de 16,5% entre os novos casos e 61,6% entre os casos previamente tratados, a maior proporção já reportada no mundo.

No Brasil, os dados sobre resistência às drogas estão relacionados nos Inquéritos Epidemiológicos de Resistência às Drogas Anti-TB realizados nos períodos de 1995-1997 e 2007-2008. Apesar destes inquéritos não serem completos, eles demonstram que as taxas de resistência a no mínimo uma droga e de MDR-TB no Brasil apresentaram um substancial aumento. A taxa de monoresistência primária para H aumentou de 4,4% para 6,0% e de R, de 1,3% para 1,5%; nos casos de resistência adquirida, o aumento foi ainda mais substancial, as taxas de H passaram de 11,3% para 15,3%, e de R de 6,6% para 8,0%.

Contudo, surpreendentemente, as taxas de multiresistência primária aumentaram apenas de 1,1% para 1,4%, enquanto as de multirresistência adquirida apresentaram uma queda de 7,9% para 7,5% .

1.5.3 Fatores de risco associados à resistência a drogas na tuberculose

De acordo com Cohen e colaboradores , existem no mínimo três determinantes que influenciam a proporção de TB resistente a drogas entre todos os casos em uma dada população. Primeiro, a quantidade de pessoas infectadas com linhagens susceptíveis e a probabilidade do desenvolvimento de TB entre aqueles infectados com estas linhagens. Segundo, a quantidade de pessoas infectadas com linhagens resistentes a drogas e a probabilidade do desenvolvimento de TB entre os infectados com essas linhagens. Terceiro, corresponde a fatores associados com a emergência de linhagens resistentes a drogas durante o tratamento entre os pacientes infectados com linhagens susceptíveis que amplificaria a resistência a drogas entre aqueles inicialmente infectados com linhagens resistentes.

Chiang et al. explicam que os dois primeiros fatores de risco são influenciados pelo risco de infecção bem como a capacidade imunológica dos infectados em conseguir conter a infecção, enquanto o terceiro fator está estritamente associado com a interação entre população bacilar e esquema de tratamento (tipo e dosagem das drogas, qualidade das drogas e aderência do paciente).

Adicionalmente, uma revisão sistemática conduzida na Europa sobre fatores de risco para multiresistência a drogas, apontou além de tratamento prévio, imigração e infecção com o HIV como fatores fortemente associados à MDR-TB . Ainda, má absorção e intolerância a drogas, e interação entre drogas, principalmente com retrovirais, também podem promover o desenvolvimento de resistência .

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A TB é uma doença re-emergente, e a frequência de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes vêm crescendo continuamente o que demanda tratamento com drogas de 2º linha, que são mais caras, mais tóxicas e menos eficazes. Desse modo, o estudo das bases moleculares desta resistência se mostra de suma importância visto que permite o entendimento dos mecanismos que geram esta, podendo futuramente contribuir para o estudo de novas drogas, ou o melhoramento das já existentes.

A presença de linhagens MDR-TB reflete deficiências nos programas de controle da tuberculose. No Brasil, dados sobre resistência à drogas da TB são fornecidos apenas através dos Inquéritos epidemiológicos, e através destes, os programas de controle da TB são baseados. Contudo, muitas vezes tais inquéritos não refletem a real situação do país, pois não incluem dados de todos os estados, inclusive de Goiás. Dessa forma, pouco se sabe sobre a real situação de casos de resistência nesta região. Uma análise de cepas circulantes no Estado traria informações sobre a qualidade e efetividade dos programas utilizados no estado, como por exemplo, as estratégias DOTS.

O diagnóstico da tuberculose na região de Goiás segue instruções do PNC-TB e é baseado principalmente em resultados de baciloscopia, exames clínicos e de raios X. Cultura e testes de sensibilidade são requeridos apenas em casos específicos, como quando o paciente apresenta sinais e sintomas característicos e baciloscopia negativa, ou em suspeita de resistência. A realização de cultura e testes de sensibilidade em todos os pacientes com baciloscopia positiva para TB podem ser de grande

importância a fim de se detectar a validade e qualidade dos procedimentos de rotina no diagnóstico da TB na região. Adicionalmente, fornece dados de maior acurácia e rapidez na determinação recente de casos de resistência a drogas, evitando dessa forma, que o paciente receba um tratamento inadequado e impedindo que o mesmo transmita linhagens resistentes aos contatos, resultando na quebra da cadeia de transmissão e evitando o aumento de resistência primária.

A análise de frequência das mutações nos genes de resistência é de suma importância, pois proporcionam dados que contribuem para a escolha de drogas a serem mais adequadas de acordo com os índices de mutações, proporcionando uma melhor adequação dos esquemas terapêuticos da região.

Adicionalmente, a caracterização molecular de linhagens resistentes por técnicas de genotipagem conferem informações a respeito do tipo de linhagem circulante, bem como se estas fazem parte de um surto ou correspondem a casos isolados de resistência, podendo ser úteis na determinação de casos fontes e/ou linhagens mais bem adaptadas na região.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Analisar o perfil de resistência, fenotípica e genotípica, das duas das principais drogas utilizadas no tratamento da tuberculose, rifampicina e isoniazida, de cepas de *M. tuberculosis* isolados de pacientes com tuberculose pulmonar atendidos no Hospital de Doenças Tropicais-HDT.

3.2- Objetivos Específicos

Determinar a resistência fenotípica dos isolados a rifampicina e isoniazida pelo método das proporções;

Analisar os principais alvos de mutação dos genes *katG*, *rpoB* e *inhA*, através do sequenciamento parcial ou PCR em tempo real;

Identificar os principais pontos de mutação dos genes e compará-los com as mutações frequentes no Brasil e no mundo;

Comparar os perfis de sensibilidade fenotípicos encontrados com genotípicos;

Determinar os perfis genéticos das linhagens resistentes através de RFLP-IS6110;

Correlacionar os genótipos com os perfis de resistência;

Metodologia

4 METODOLOGIA

A sequencia experimental está representada na figura 2. A metodologia utilizada nos experimentos estão representados no Manuscrito 1 intitulado: “**A high prevalence of resistance in new tuberculosis cases of midwestern Brazil**”, publicado em julho de 2010 na revista Infection, Genetics and Evolution .

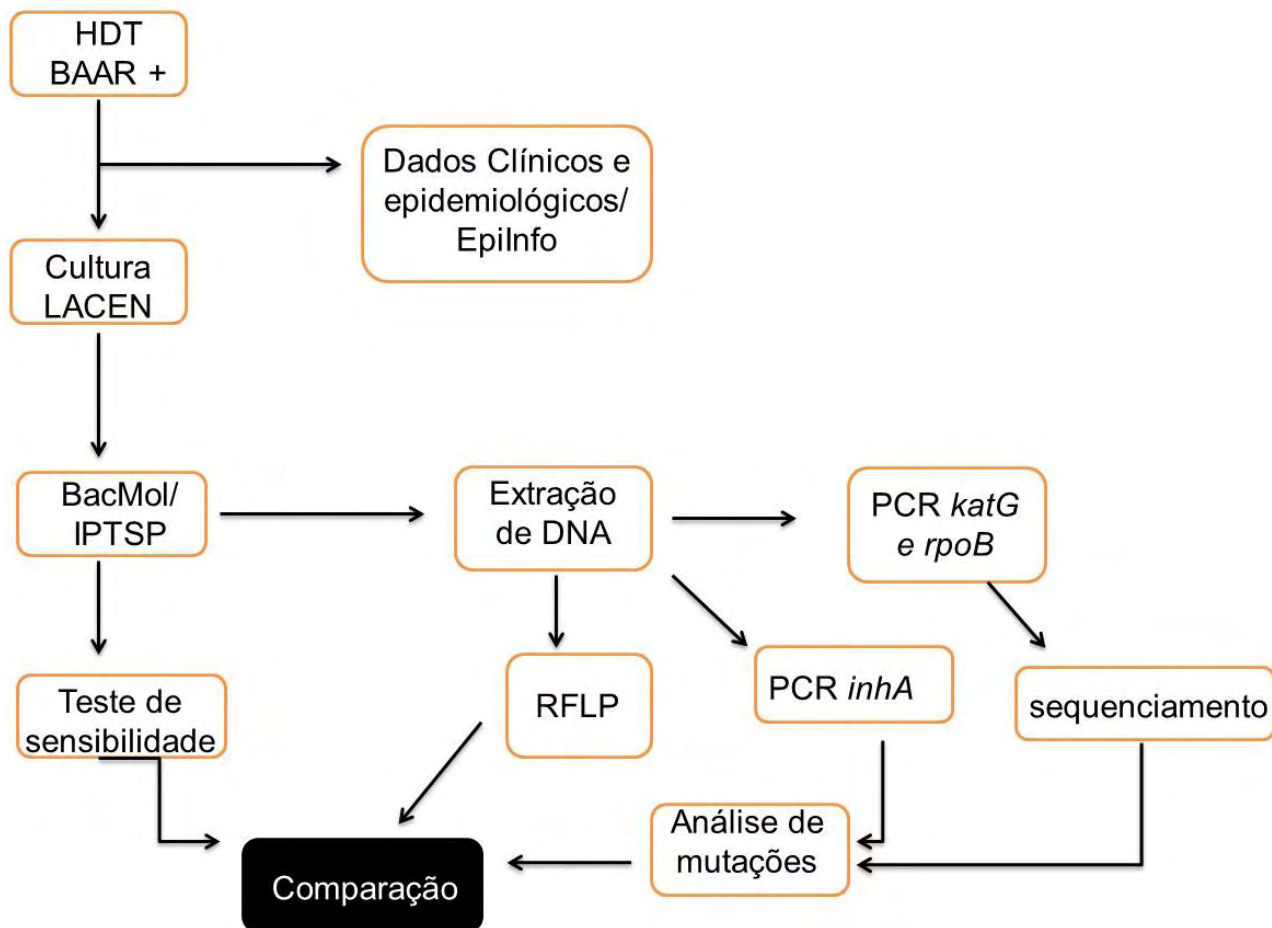


Figura 3- Esquema representativo dos experimentos realizados para a análise de resistência aos antimicrobianos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas no estado de Goiás.

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão representados no Manuscrito 1 intitulado: “**A high prevalence of resistance in new tuberculosis cases of midwestern Brazil**”, publicado em julho de 2010 na revista *Infection, Genetics and Evolution* .



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

A high prevalence of resistance in new tuberculosis cases of midwestern Brazil

Lorena Cristina Santos, Hesther de Macedo Bousquet, Alyne Melo Pereira, Ana Paula Junqueira-Kipnis, André Kipnis*

Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 esq./1ª Avenida, S/N, Setor Universitário, CEP 74605-050 Goiânia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 March 2010
 Received in revised form 28 June 2010
 Accepted 28 June 2010
 Available online 7 July 2010

Keywords:

Tuberculosis
 Resistance
 Isoniazid
 Rifampin
 Sequencing
 Genotyping

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a serious worldwide public health problem, and drug resistance, particularly multidrug resistance (MDR), is a critical factor involved in TB control. We analyzed *Mycobacterium tuberculosis* isolates from 132 new TB cases of treatment-naïve patients in Goiás, Brazil by drug susceptibility tests, partial sequencing of the *rpoB* and *katG* genes, *inhA*^{C-15T} mutation analysis by PCR, and RFLP-IS6110 genotyping. A high frequency of drug resistance was observed in previously untreated patients (13.6% to at least one antibiotic and 6.1% MDR-TB), and a high rate DNA polymorphism was detected in these strains. These results suggest that the prevalence of resistant TB is underestimated and that resistance in new TB cases was not associated with an outbreak in this region. We recommend routine culture and susceptibility testing for all new TB cases in Goiás for the appropriate treatment and control of this disease.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Although tuberculosis (TB) is a curable disease, it is a serious global public health problem and a major cause of death resulting from infectious disease (WHO, 2008a). The high prevalence of TB is assumed to result from poverty, the HIV epidemic, and inadequate diagnosis and treatment (Caws et al., 2008). A steady increase in the frequency of *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to one or more agents commonly used to treat TB including isoniazid (INH), rifampin (RMP), streptomycin (STR), ethambutol (EMB), or pyrazinamide (PZA) (Snider et al., 1991) is of concern.

The acquisition of resistance by mycobacteria is a random event resulting from spontaneous chromosomal mutations that may be selected for by single-drug therapy, poor patient treatment adherence, or improper diagnosis (Valim et al., 2000). INH and RMP are key drugs in TB management and according to the World Health Organization (WHO), *M. tuberculosis* strains that are resistant to at least two of the aforementioned drugs are considered multidrug-resistant (MDR) (WHO, 2008a). MDR-TB is a great concern in the antibiotic resistance pandemic due to the

high risk of death and because patients can remain infected for months or years. Further, MDR-TB requires treatment with second-line drugs that have limited treatment efficacy with more toxicity (Valim et al., 2006; Dye and Williams, 2000).

INH is a prodrug that must be metabolized by mycobacterial catalase–peroxidase for its antibacterial activity. The genetic basis of INH resistance in *M. tuberculosis* involves several genes including *katG*, *inhA*, *kasA*, *ndh* and *ahpC* (Slayden and Barry, 2000). However, most INH resistance in clinical isolates results from blocking prodrug activation through mutations in the *katG* gene that alter or eliminate mycobacterial catalase–peroxidase activity (Cohen et al., 2004). Such mutations have been identified in up to 90% of INH-resistant strains, and one particular substitution in *katG* codon 315 is the most frequently reported causative mutation (Slayden and Barry, 2000).

RMP binds to the β -subunit of RNA polymerase and results in transcription inhibition (Zhang and Telenti, 2000). Previous studies have identified mutations in a hotspot of the *rpoB* gene (codons 432–458 in *M. tuberculosis*, named cluster I) in 94–98% of *M. tuberculosis* RMP-resistant strains (Hillemann et al., 2005).

It is estimated that more than 50 million people are infected with TB in Brazil with approximately 100,000 new cases per year. Brazil ranks 16th among the 22 countries with the highest TB burden, and together, these countries account for approximately 80% of the estimated number of new TB cases each year. While Brazil maintains a high rate of TB infection, the number of MDR-TB cases (2372) reported between October 1995 and August 2006 has not elicited public health concern. The WHO estimates the rate of

* Corresponding author. Tel.: +55 62 3209 6104; fax: +55 62 3209 6363.
 E-mail addresses: lorenacsantos@yahoo.com.br (L.C. Santos), hestherbousquet@hotmail.com (H.d.M. Bousquet), yulelyne@hotmail.com (A.M. Pereira), anapaula@iptsp.ufg.br (A.P. Junqueira-Kipnis), akipnis@iptsp.ufg.br (A. Kipnis).

Table 1
Resistance patterns of 132 *M. tuberculosis* strains isolated from patients of an infectious disease reference hospital in Goiânia.

Strain code	Phenotypic resistance profile	<i>katG</i> mutation	<i>rpoB</i> mutation
08HDT ^a	INH, RMP	Ser302Thr	Ser450Leu
25HDT ^a	INH, RMP	Ser315Thr	His445Tyr
71HDT ^a	INH, RMP	^b	Ser450Leu
131HDT ^a	INH, RMP	^b	Ser450Leu
138HDT ^a	INH, RMP	^b	Ser450Leu
153HDT ^a	INH, RMP	^b	Ser450Leu
1362HDT ^a	INH, RMP	^b	Ser450Leu
CR11HDT ^a	INH, RMP	^b	Ser450Leu
120HDT	RMP		Ser450Leu
49HDT	INH	Ser315Asn	
56HDT	INH	^b	
69HDT	INH	^b	
91HDT	INH	^b	
93HDT	INH	Ser315Thr	
100HDT	INH	^b	
142HDT	INH	Ser315Thr	
143HDT	INH	Ser315Thr	
146HDT	INH	Ser315Thr	

^a MDR-TB strains.

^b No mutation in the studied region.

our study. The majority of study participants were male (80.3%), 77.3% had a BCG scar, 40.9% used tobacco or alcohol, 20.5% had an HIV co-infection, 9.9% used illicit drugs and 5.1% lived in high-risk locations such as prisons or were homeless. The age of the patients ranged from 1 to 77 years, but most (68.1%) were between the ages of 21 and 50.

The susceptibility of 132 *M. tuberculosis* isolates to INH and RMP was tested. Resistance to at least one drug was detected in 18 strains (13.6%). A single isolate was only resistant to RMP while 9 were INH mono-resistant (Table 1). Surprisingly, 8 isolates (6.1%) were resistant to both INH and RMP and were considered to be

MDR-TB isolates. There was no risk factor predisposition for MDR-TB infection among the patients, and all of the patients with drug-resistant strains were not previously treated (Table 2).

Partial sequencing of the *rpoB* and *katG* genes, the main targets of RMP and INH, respectively, was performed to characterize the previously observed resistance. Sequencing did not detect additional resistant isolates. Nine RMP-resistant strains presented two types of *rpoB* mutations; a mutation in codon 450 (TCG → TTG) of *rpoB* resulting in a serine to leucine substitution was the most frequent (8 of 9 RMP-resistant isolates) while a mutation in codon 445 (CAC → TAC) resulting in substitution of a histidine residue with tyrosine was found in the remaining isolates. A causative mutation was identified in the *rpoB* genes of all RMP-resistant strains in this study.

Resistance to INH was the most frequent, but a minority (7 of 17) of INH-resistant strains had mutations in *katG* that were responsible for the observed phenotype. A missense mutation in codon 315 was the most prevalent; an AGC → ACC (Ser315Thr) mutation was present in five strains, and one strain had an AGC → AAC (Ser315Asn) mutation at this position. Additionally, one strain had a mutation in codon 302 (AGC → ACC; Ser302Thr) (Table 1). PCR analysis of the remaining INH resistant strains that did not present mutation by partial *katG* gene sequencing revealed that 4 isolates had the *inhA*^{C-15T} mutation.

Possible relatedness between the resistant strains was addressed by DNA fingerprinting. The genetic relationship of the clinical *M. tuberculosis* strains was performed using an IS6110 probe, and all strains showed unique IS6110 patterns (Fig. 1).

4. Discussion

Few Brazilian reference hospitals and clinics routinely perform drug susceptibility tests for *M. tuberculosis*. Surprisingly, a high frequency of resistance to at least one antibiotic (13.6%) was detected in isolates obtained from new cases of active TB in Goiás,

Table 2
Analysis of potential risk factors associated with resistance to isoniazid and rifampin.

Characteristics	Frequency (%)	No resistance ^a	Any drug resistant ^b	P-value ^c ; OR ^d (IC ^e)
Gender				
Female	26 (19.7%)	20	6	0.20; 2.35 (0.64–7.74)
Male	106 (80.3%)	94	12	
Age				
21–50	90 (68.2%)	78	12	1; 0.92 (0.32–2.66)
<20, 50	42 (31.8%)	36	6	
BCG vaccination				
Yes	102 (77.3%)	90	12	0.36; 0.53 (0.18–1.57)
No	30 (22.7%)	24	6	
Previous TB				
Yes	23 (17.4%)	23	0	0.043; NA
No	109 (82.6%)	91	18	
HIV status				
Yes	27 (20.5%)	21	6	0.20; 2.21 (0.75–6.58)
No	105 (79.5%)	93	12	
Tobacco/alcohol				
Yes	54 (40.9%)	51	3	0.037; 0.25 (0.07–0.09)
No	78 (59.1%)	63	15	
Homeless/prison				
Yes	7 (5.3%)	7	0	0.059; NA
No	125 (94.7%)	107	18	

NA: not applicable.

^a Number of strains without phenotypic resistance to both INH and RMP.

^b Number of strains with phenotypic resistance to either INH, RMP or both.

^c χ^2 test was used when a or b for any group was greater than 5, otherwise Fisher's exact test was used.

^d Odds ratio

^e 95% confidence interval.

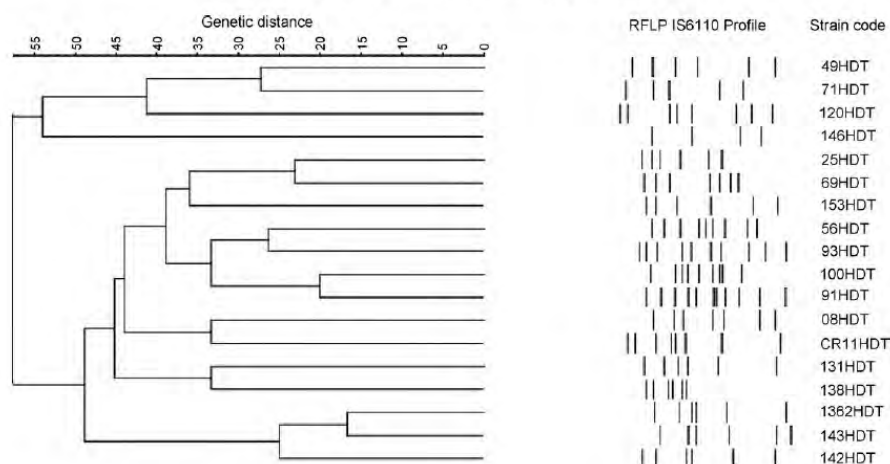


Fig. 1. Dendrogram showing the similarity between IS6110-RFLP patterns of 18 isolates from resistant pulmonary tuberculosis patients in Goiás, Brazil. The dendrogram was generated by Bionumerics software (Windows version 4.0; Applied Maths). The similarity matrix and dendrogram were constructed with the DICE similarity coefficient and the UPGMA algorithm using a position tolerance of 1.5%.

Brazil. This frequency is well above the expected rate due to spontaneous mutations in a TB treatment-naïve population compared to other regions of Brazil or the world.

The MDR rate among treatment-naïve patients in this study (6.1%) was higher than in Iran (0.95%, Namaei et al., 2006), Turkey (4.8%, Ozturk et al., 2005b), Tanzania (2.7%, Kibiki et al., 2007), and other regions of Brazil such as Rio de Janeiro (3.9%, Mendes et al., 2007), Bahia (2.1%, Matos et al., 2007) and Rio Grande do Sul (1.3%, Mattos et al., 2006).

M. tuberculosis acquires drug resistance through selection by antibiotic exposure for mutations that occur randomly at chromosomal loci. Individual nucleotide changes (point mutations) confer resistance to single drugs, and the stepwise accumulation of these mutations results in MDR-TB (Ozturk et al., 2005a; Soini and Musser, 2001). An analysis of mutations in the hotspot region of the *rpoB* gene revealed that all of the RMP-resistant *M. tuberculosis* isolates in this study possessed causative mutations. Most (89%) of the RMP-resistant strains were MDR, reinforcing the use of RMP-resistance as a surrogate marker for the detection of MDR-TB in Brazil (Heep et al., 2001).

Mutations in *katG* codon 315 decrease INH prodrug activation but maintain the mycobacterial catalase-peroxidase activity (Hazbon et al., 2006; Kapetanaki et al., 2005; Wei et al., 2003). This type of mutation was the most frequently observed in INH-resistant strains. A missense mutation at codon 315 (AGC → ACC; Ser315Thr) was detected most frequently in this study (7 of 17 INH-resistant strains) and in others (Costa et al., 2009; Lavender et al., 2005). The remaining ten INH resistant isolates were investigated for mutation in the *inhA* gene and four of them were mutant strains. However, we could not assign mutations in all of the INH-resistant strains, which may be due to INH resistance caused by mutations in other genes including *ahpC* (Sherman et al., 1996), *ndh* (van Soolingen et al., 2000), *kasA* (Lee et al., 1999), or in regions of the *katG* gene not analyzed in this study (Brimacombe et al., 2007).

The prevalence of mutations in the *katG* codon 315 among INH-resistant *M. tuberculosis* strains in our study was 41%, lower than reported in other countries (Martila et al., 2008; Jiao et al., 2007; Nusrath Unissa et al., 2008; Mokrousov et al., 2002) and Brazilian states (Silva et al., 2003). The frequency of mutation in the *inhA*

gene found in our study, 23.5%, significantly enhanced the molecular assignment of the resistance although the use of this approach in our and different setting of Brazil needs to be further investigated. Our data suggest that while a mutation in codon 315 is the most common cause of INH resistance, geographical strain differences could be responsible for variation in the observed prevalence.

Several factors have been identified that can influence the clustering of strains including the incidence of the illness, heterogeneity of the population, inclusion of hospital or outpatient isolates, geographical and temporal contexts, and differences in prevalence, among others (Malaghini et al., 2009; Strassle et al., 1997; Chevrel-Dellagi et al., 1993). Population-based studies of TB clinical isolates with unique IS6110-RFLP patterns, especially in highly mobile urban settings, suggest that those isolates resulted from reactivation of a previous infection (Malaghini et al., 2009; Alland et al., 1994).

Genetic analysis by the UPGMA algorithm revealed that the resistant strains in our study exhibited a high degree of DNA polymorphism, favoring the hypothesis of independent acquisitions of resistance. These findings contradict other studies in which few MDR-TB strains were associated with large outbreaks and extensive transmission in various regions of the world, such as with the Beijing family strains (Bifani et al., 2002; Glynn et al., 2002).

Over time, the interactions between the host, pathogen, and environment select the most successful genotypes within particular geographic locations (Gagneux et al., 2006). However, this phenomenon was not observed in our study, suggesting that the adaptations were present in these strains without selection. Furthermore, these strains do not represent an outbreak of one or few resistant strains because no particular strain was better adapted than others. Based on this observation, the high prevalence of resistant strains among previously untreated TB patients in the studied region could be explained by the transmission of primary resistant strains in Goiás or through the reactivation of a preexisting resistant TB infection. However, the latter possibility was eliminated in our study because there was no correlation between previous TB infection and resistance.

The surveillance for the control of TB in Goiás follows the guidelines of the national TB control program (Ruffino-Netto, 2001), and TB diagnosis is mainly based on results of sputum acid-fast microscopy, radiography, and clinical exams. Culture and susceptibility tests are required only in specific situations, such as when there is suspicion of resistance (Brasil, 2005). Our study evaluated 64.4% of all new TB cases in Goiás between January 2006 and July 2007 that normally would not have been cultured or subjected to susceptibility testing. The high observed prevalence of resistance calls for immediate action to modify the TB diagnosis procedure.

This study has some limitations, with an important one being that we did not analyze all sputum-positive TB cases presented during the sampling period. Nevertheless, we believe that this does not bias our results because we tested most of the new TB cases without any exclusion criteria. Additionally, we only analyzed part of the *katG* and *inhA* genes for INH resistance, and resistance can involve other genes including *ahpC*, *ndh*, *kasA* or other unanalyzed regions of *katG*.

Based on these results, we conclude that 13.6% of the TB strains circulating in Goiás, Brazil exhibited resistance to at least one drug (INH and/or RMP), and 6.1% of the strains were MDR-TB. Considering the high rate of DNA polymorphism observed between those strains, we infer that there is a high rate of primary resistant TB in Goiás.

Acknowledgements

We are thankful to Sueli Lemes de Avila from the Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros for providing bacterial strains. This study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil). L.C.S. received a Doctoral fellowship from CAPES-REUNI, FAPEG-Rede Goiana de Pesquisa em Tuberculose.

References

- Alland, D., Kalkut, G.E., Moss, A.R., Mcadam, R.A., Hahn, J.A., Bosworth, W., Drucker, E., Bloom, B.R., 1994. Transmission of TB in New York City: an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N. Engl. J. Med.* 330, 1710–1716.
- Araujo-Filho, J.A., Vasconcelos-Jr, A.C., Sousa, E.M., Silveira, C., Ribeiro, E., Kipnis, A., Kipnis, A.P.J., 2008. Extensively drug-resistant TB: a case report and literature review. *Braz. J. Infect. Dis.* 12 (5), 447–452.
- Bifani, P.J., Mathema, B., Kurepina, N.E., Kreiswirth, B.N., 2002. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.* 10 (1), 45–52.
- Brasil, 2005. Manual de Bacteriologia da Tuberculose, 3rd edition. Ministério da Saúde, Funasa, Rio de Janeiro.
- Brimacombe, M., Hazbon, M., Motiwala, A.S., Alland, D., 2007. Antibiotic resistance and single-nucleotide polymorphism cluster grouping type a multinational sample of resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob. Agents Chem.* 51 (11), 4157–4159.
- Canetti, G.W., Fox, A., Khomenko, H.T., Mahler, N.K., Menon, D.A., Mitchison, N., Rist, N., Smeley, N.A., 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull. WHO* 41, 21–43.
- Caws, M., Thwaites, G., Dunstan, S., Hawn, T.R., Lan, N.T.N., Thuong, N.T., Stepniewska, K., Huyen, M.N., Bang, N.D., Loc, T.H., Gagneux, S., van Soolingen, D., Kremer, K., van der Sande, M., Small, P., Anh, P.T., Chinh, N.T., Quy, H.T., Duyen, N.T., Tho, D.Q., Hieu, N.T., Torok, E., Hien, T.T., Dung, N.H., Nhu, N.T., Duy, P.M., van Vinh Chau, N., Farrar, J., 2008. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathol.* 4 (3).
- Chevrel-Dellagi, D., Abderrahman, A., Haltiti, R., Koubaji, H., Gicquel, B., Dellagi, K., 1993. Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 31 (9), 2446–2450.
- Cohen, T., Becerra, M.C., Murray, M.B., 2004. Isoniazid resistance and the future of drug-resistant tuberculosis. *Microb. Drug Resist.* 10 (4), 280–285.
- Costa, E.R.D., Ribeiro, M.O., Silva, M.S.N., Arnold, L.S., Rostirolla, D.C., Cafrune, P.I., Espinoza, R.C., Palaci, M., Telles, M.A., Ritacco, V., Suffys, P.N., Lopes, M.L., Campelo, C.L., Miranda, S.S., Kremer, K., Silva, P.A., Fonseca, L.S., Ho, J.L., Kritski, A.L., Rossetti, M.L.R., 2009. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol.* 9, 39.
- Dye, C., Williams, B.G., 2000. Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8180–8185.
- Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., Jong, B.C., Narayanan, S., Nicol, M., Niemann, S., Kremer, K., Gutierrez, M.C., Hilty, M., Hopewell, P.C., Small, P.M., 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 2869–2873.
- Glynn, J.R., Whiteley, J., Bifani, P.J., Kremer, K., van Soolingen, D., 2002. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (8), 843–849.
- Hazbon, M.H., Brimacombe, M., Valle, M.B., Cavatore, M., Guerrero, M.J., Brasil, M.V., Jacobs, H.B., Lavender, C., Fyfe, J., Garcia, L.G., Leon, C.I., Bose, M., Chaves, F., Murray, M., Eisenach, K.D., Osornio, J.S., Cave, M.D., Leon, A.P., Alland, D., 2006. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chem.* 50 (8), 2640–2649.
- Heep, M., Brandstatter, B., Rieger, U., Lehn, N., Richter, E., Gerdes, S.R., Niemann, S., 2001. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39 (1), 107–110.
- Herrera-León, L., Molina, T., Saiz, P., Sáez-Nieto, J.A., Jiménez, M.S., 2005. New multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chem.* 49 (1), 144–147.
- Hillemann, D., Weizenegger, M., Kubica, T., Richter, E., Niemann, S., 2005. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3699–3703.
- Jiao, W.W., Mokrousov, I., Sun, G.Z., Li, M., Liu, J.W., Narvskaya, O., Shen, A.D., 2007. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China. *Chin. Med. J.* 120, 814–819.
- Kapetanaki, S.M., Chouchane, S., Yu, S., Zhao, X., Magliozzo, R.S., Schalvis, J.O., 2005. *Mycobacterium tuberculosis* katG(S315T) catalase-peroxidase retains all active site properties for proper catalytic function. *Biochemistry* 44, 243–252.
- Kibiki, G.S., Mulder, B., Dolmans, W.M.V., Beer, J.L., Boeree, M., Sam, N., van Soolingen, D., Sola, C., Van der Zanden, A.G.M., 2007. *M. tuberculosis* genotypic diversity and drug susceptibility pattern in HIV-infected and non-HIV-infected patients in northern Tanzania. *BMC Microbiol.* 7 (51).
- Lavender, C., Globan, M., Sievers, A., Jacobs, H.B., Fyfe, J., 2005. Molecular Characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Australia. *Antimicrob. Agents Chem.* 49 (10), 4068–4074.
- Lee, A.S.G., Lim, I.H.K., Tang, L.L.H., Telenti, A., Wong, S.Y., 1999. Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2087–2089.
- Malaghini, M., Brockelt, S.R., Burger, M., Kritski, A., Soccol, V.T., 2009. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the State of Paraná in southern Brazil. *Tuberculosis* 89 (1), 101–105.
- Marttila, H.J., Makinen, J., Marjamaki, M., Ruutu, P., Soini, H., 2008. Molecular genetics of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Finland, 1995–2004. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12, 338–343.
- Matos, E.D., Lemos, A.C.M., Bittencourt, C., Mesquita, C.L., 2007. Anti-tuberculosis drug resistance in strains of *M. tuberculosis* isolated from patients in a tertiary hospital in Bahia. *Braz. J. Infect. Dis.* 11 (3), 331–338.
- Mattos, I.G., Ribeiro, M.O., Netto, I.C.O., Azevedo, P.A., 2006. Tuberculosis: a study of 111 cases in an area of high prevalence in the extreme South Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 10 (3), 194–198.
- Mendes, J.M., Lourenco, M.C., Ferreira, R.M.C., Fonseca, L.S., Saad, M.H.F., 2007. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from sputum samples from symptomatic outpatients—Complexo de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. *J. Braz. Pneumol.* 33 (5), 579–582.
- Ministério da Saúde.
- Mokrousov, I., Narvskaya, O., Otten, T., Limeschenko, E., Steklova, L., Vyshnevskiy, B., 2002. High prevalence of *katG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1417–1424.
- Namaei, M.H., Naderinasab, M., Ziaee, M., 2006. Prevalence of primary drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mashhad, Iran. *Indian J. Med. Res.* 124, 77–80.
- Nusrath Unissa, A., Selvakumar, N., Narayanan, S., Narayanan, P.R., 2008. Molecular analysis of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 71–75.
- Ozturk, C.E., Sanic, A., Kaya, D., Ceyhan, I., 2005a. Molecular analysis of isoniazid, rifampin and streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Duzce, Turkey. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58, 309–312.
- Ozturk, C.E., Balbey, O.A., Kaya, D., Ceyhan, I., Bulut, I., Sahin, I., 2005b. The resistance to major antituberculosis drugs of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from the respiratory system specimens of tuberculosis patients in Duzce, Turkey. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58, 47–49.
- Ruffino-Netto, A., 2001. Tuberculosis in Brazil: general information and news perspectives. *Informe Epidemiológico do SUS* 10 (3), 129–138.
- Siddiqi, N., Shamim, M., Hussain, S., Choudhary, R.K., Ahmed, N., Prachee, Banerjee, S., Savithri, G.R., Alam, M., Pathak, N., Amn, A., Hanief, M., Katoch, V.M., Sharma, S.K., Hasnain, S.E., 2002. Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in North India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2), 443–450.
- Silva, M.S.N., Senna, S.G., Ribeiro, M.O., Valim, A.R.M., Telles, M.A., Kritski, A.L., Morlock, G.P., Cooksey, R.C., Zaha, A., Rossetti, M.L.R., 2003. Mutations in *KatG*,

- inhA, and ahpC genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41 (9), 4471–4474.
- Sherman, D.R., Mdluli, K., Hickey, M.J., Arain, T.M., Morris, S.L., Barry, C.E., Stover, C.K., 1996. Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 272, 1641–1643.
- Strassle, A., Putnik, J., Weber, R., Fehr-Merhof, A., Wust, J., Pfyffer, G.E., 1997. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in a human immunodeficiency virus cohort in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 35, 274–278.
- Slayden, R.A., Barry, C.E., 2000. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 2, 659–669.
- Snider Jr., D.E., Cauthen, G.M., Farer, L.S., Kelly, G.D., Kilburn, J.O., Good, R.C., Dooley, S.W., 1991. Drug-resistant tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 732.
- Soini, H., Musser, J.M., 2001. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin. Chem.* 47, 809–814.
- Valim, A.R., Possuelo, L.G., Cafrune, P.I., Borges, M., Ribeiro, M.O., Rossetti, M.L., Zaha, A., 2006. Evaluation and genotyping of multidrug-resistant cases of tuberculosis in Southern Brazil. *Microb. Drug Resist.* 12 (3), 186–191.
- Valim, A.R., Rossetti, M.L., Ribeiro, M.O., Zaha, A., 2000. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 38 (8), 3119–3122.
- van Embden, J.D., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J.W., Eisenach, K.D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T.M., Small, P.M., 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31 (2), 406–409.
- van Soolingen, D., Haas, P.E., van Doorn, H.R., Kuijper, E., Rinder, H., Borgdorff, M.W., 2000. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* 182, 1788–1790.
- van Soolingen, D., de Haas, P.E., Hermans, P.W., van Embden, J.D., 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* 235, 196–205.
- Wei, C.J., Lei, B., Musser, J.M., Tu, S.C., 2003. Isoniazid activation defects in recombinant *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (*katG*) mutants evident in *InhA* inhibitor production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 670–675.
- WHO, 2008a. World Health Organization Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World Fourth Global Report. WHO, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2008b. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. World Health Organization, Geneva, Brazil: country profile, pp. 89–92.
- Zhang, Y., Telenti, A., 2000. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Herfull, G.F., Jacobs, Jr., W.R. (Eds.), *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington, DC, pp. 235–251.

Considerações finais

Ao longo dos anos, tem sido mostrado constantemente que resistência às drogas em TB está estritamente associada com tratamento prévio, ou seja, resistência adquirida, e que a prevalência de resistência às drogas entre os casos previamente tratados é muito maior que entre os casos novos . Contudo, apesar de esta ser a forma mais comum de aquisição de resistência, o número de casos de resistência primária vem crescendo nos últimos anos . A resistência adquirida consiste em relapso, omissão após o início do tratamento e/ou falência do mesmo. E apesar de vários estudos demonstrarem que linhagens resistentes perdem e/ou diminuem sua capacidade de transmissão, existem várias evidências que provam o contrário, como a série de surtos envolvendo linhagens MDR-TB em hospitais , entre profissionais de saúde , presídios , e na comunidade .

Como resistência às drogas entre os casos novos implica transmissão e entre os casos previamente tratados é uma combinação da emergência de resistência adicional durante o tratamento, re-infecção por linhagens resistentes ou resistência primária que não foi identificada no começo do tratamento, percebe-se a necessidade primordial de se evitar o surgimento da resistência adquirida através da melhora de programas, como por exemplo, as estratégias DOTS; melhora no diagnóstico e detecção de linhagens resistentes; e o controle da transmissão de TB, a fim de se evitar a dispersão de linhagens resistentes e o aumento do número de casos de resistência primária. Tal fato é consistente com estudos que indicam que áreas geográficas com alta prevalência de resistência a drogas têm história de pobres programas de controle de TB bem como o uso generalizado e incontrolado de drogas anti TB .

O diagnóstico da TB, normalmente é baseado em probabilidades, com informações que aliam aspectos clínicos e radiológicos, sendo a baciloscopia, a procura de bacilos álcool-ácido resistentes, o principal exame microbiológico. Exames como cultura e testes de suscetibilidade são requeridos apenas em casos específicos, como por exemplo, suspeita de resistência devido a baciloscopia positiva após 2 meses de tratamento. O presente trabalho demonstrou que 13,1% dos pacientes avaliados, que normalmente não teriam suas amostras submetidas à cultura e a testes de sensibilidade, apresentaram resistência à no mínimo um antimicrobiano utilizado no tratamento da TB. Tais pacientes provavelmente foram tratados com o esquema terapêutico básico, e só após no mínimo dois meses, as entidades de saúde suspeitariam de resistência. Tal fato alarma para a imediata necessidade de se rever e modificar os procedimentos utilizados nos casos de TB, a fim de se ter um rápido e preciso diagnóstico, levando a um melhor tratamento ao paciente, bem como evitar a transmissão, da TB e de linhagens resistentes, aos seus contatos.

Vários estudos têm reportado que algumas linhagens resistentes, como as da família Beijing, são responsáveis por grandes surtos em determinadas áreas geográficas, devido a uma melhor adaptação destas em relação as demais linhagens circulantes (Li et al. 2010; Niemann et a. 2010; Marais et al. 2006).

Nossos resultados contradizem tais estudos, visto que houve grande variabilidade de linhagens resistentes na região do estudo. Nós sugerimos três possíveis hipóteses para tal situação: 1- a origem desses pacientes não foi considerada no estudo, dessa forma, como o hospital onde foram coletadas as amostras é referência para o estado de Goiás, recebendo pacientes de diferentes cidades, há possibilidades de que realmente não haja transmissão entre esses pacientes visto que eles não são contatos ou não tenham possibilidades de encontros casuais; 2- o alto poder discriminatório da técnica utilizada, que acabou resultando na separação de possíveis transmissões entre os pacientes incluídos no estudo; 3- o último, e mais provável, se todos os pacientes são casos novos, tratando-se dessa forma de resistência primária, espera-se que existam “casos fontes de resistência” os quais não estavam incluídos no presente trabalho, sugerindo que as taxas de resistência na região do estudo podem estar ainda mais subestimadas.

Diante disso, percebe-se que o controle da TB não é uma tarefa fácil, visto que envolve um conjunto de fatores que não são resolvidos com medidas pontuais. Necessita-se, entre outras medidas, de investimentos, na tentativa de melhorar o tratamento existente, com a utilização de esquemas mais rápidos e eficazes bem como no apoio a pesquisa de novos fármacos, a fim de se evitar o surgimento de linhagens resistentes. Deve-se desenvolver uma nova vacina ou o melhoramento da já existente, para que o próprio sistema imune seja mais bem sucedido que o bacilo da TB. É preciso diagnosticar eficazmente os latentes tratando-os para que estes não venham a ficar doentes; diagnosticar rapidamente os doentes e os resistentes e garantir a correta adesão destes ao tratamento, evitando o surgimento e a transmissão de cepas resistentes; porém mais que tais medidas, é preciso conscientizar que governo e população têm papéis fundamentais no controle da TB e que é preciso que ambos se empenhem para uma melhora substancial de seus índices no mundo.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

.

- Através do presente estudo, podemos concluir que há uma alta incidência de resistência primária aos antimicrobianos entre os casos novos de TB na região do estudo;

- Dentre 132 pacientes analisados, isolados de *M. tuberculosis* de 18 apresentaram algum tipo de resistência fenotípica pelo método das proporções de Canetti (mono ou multi-resistência), contudo, mutações nos respectivos genes analisados foram detectadas em 12 isolados.
- As mutações, tanto no gene *rpoB* quanto no *katG*, encontradas no presente estudo são as mais frequentes no Brasil e no mundo. Contudo, houve uma menor frequência de mutações no códon 315 que o esperado e uma maior frequência no gene *inhA* (C-15T).
- Nenhum cluster foi observado dentre as linhagens sugerindo que provavelmente os casos de resistência na região estão relacionados com resistência primária.

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbadi S, Rashed HG, Morlock GP et al. Characterization of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and mechanisms of antimicrobial resistance for multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from a major reference hospital in Assiut, Egypt. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (6):2330-4.

Ahmad S, Mokaddas E. Contribution of AGC to ACC and other mutations at codon 315 of the katG gene in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from the Middle East. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23 (5):473-9.

Ahmad S, Araj GF, Akbar PK et al. Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from the Middle East. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38 (4):227-32.

Alangaden GJ, Kreiswirth BN, Aouad A et al. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42 (5):1295-7.

Alcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41 (10):2270-3.

Antonova OV, Gryadunov DA, Lapa SA et al. Detection of mutations in Mycobacterium tuberculosis genome determining resistance to fluoroquinolones by hybridization on biological microchips. *Bull Exp Biol Med* 2008; 145 (1):108-13.

Anexo

Review: The molecular basis of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

Lorena Cristina Santos^a, Ana Paula Junqueira-Kipnis^a, André Kipnis^{a*}

^aDepartamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 esq./ 1^a Avenida, S/N, Setor Universitário, Goiânia, Brazil, CEP 74605-050.

* Corresponding author: akipnis@iptsp.ufg.br; Tel: 55 62 3209-6104 Fax: 55 62 3209 6363

Email addresses: lorenacsantos@yahoo.com.br (L.C. Santos); anapaula@iptsp.ufg.br (A. P. Junqueira-Kipnis).

Abstract

Tuberculosis is a serious global public health problem and its high prevalence is strongly associated with the increase of drug resistance. This steady increase in the frequency of *M. tuberculosis* strains resistant to one or more agents commonly used to tuberculosis treat has drawn worldwide attention

about to understanding the molecular basis of resistance in *M. tuberculosis*. TB resistance is a great concern in the antibiotic resistance pandemic due to the high risk of death, because patients can remaining infected for months or years and because de treatment difficulty. A molecular understanding of the series of events that render *M. tuberculosis* multi-drug resistant is very important due to find a fast and appropriated diagnosis as well as a novel target for new drugs.

Keywords: Tuberculosis, drug resistance, mutations

Introduction

Tuberculosis (TB) still persists as a major cause of morbidity and mortality, affecting almost a third of the world's population, remaining one of the biggest public health problems in the 21st century. Although TB is a curable disease, some factors have been identified as reasons for a mounting global TB burden as inadequate detection, cure rates, and Aids, resulting in individuals more susceptible to development of TB . A steady increase in the frequency of *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to one or more agents commonly used to treat TB including isoniazid (INH), rifampin (RMP), streptomycin (STR), ethambutol (EMB), or pyrazinamide (PZA), components of the first-line multidrug therapy, is also of concern .

Chemotherapy for TB consists in a two-stage process, including three or more drugs, beginning with an initial stage of bacterial eradication, followed by a second stage devoted to elimination of more resistant or latent organisms. The necessity of using a combined therapy may be explained by the historical reports of treatment using a single drug resulting in the selection of resistant strains and treatment failure . Additionally, in a mycobacterial population, there are different populations of bacilli, and each can present a different susceptibility profile for anti-TB drugs .

Mobile genetics elements such as plasmids and transposons, which are known to mediate drug resistance in various bacterial species, do not do so in *M. tuberculosis* . In a population of *M. tuberculosis*, resistance to anti-TB drugs is due spontaneous chromosomal mutations that occur at a relatively low frequency, 10^{-6} to 10^{-8} mycobacterial replications. Individual nucleotide changes (point mutations) confer resistance to single drugs, and the sequential accumulation of these mutations in different genes involved results in multi-drug resistance (MDR-TB) .

According to the World Health Organization (WHO), in order to be considered MDR-TB, the *M. tuberculosis* strain should be resistant to at least RMP and INH . Treating TB in these patients is difficult, as they carry strains resistant to the two most efficient anti-TB drugs. These strains require treatment with second-line drugs that have limited treatment efficacy with more toxicity . Additionally, in the last two

decades, with the misuse of other drugs with anti-TB action, in particular the fluoroquinolones (FQs), the most effective among the second-line drugs, resistance has broadened to extensively drug-resistant TB (XDR-TB defined as MDR-TB with additional bacillary resistance to FQs and at least one second-line injectable drug) .

Clinically significant drug resistance in TB may develop during anti-TB treatment (acquired resistance). Anti-TB drugs impose selection pressure in a population of *M. tuberculosis* in which resistant mutants gradually outnumber susceptible bacilli and emerge as the dominant strains. Several factors result in this selection pressure such as: monotherapy due to irregular drug supply, inappropriate doctor prescription and, most importantly, poor patient adherence to treatment . Once resistant bacillary strains emerge during treatment, these could be transmitted in a community. Those who are infected with drug-resistant strains may develop drug-resistant TB prior to treatment (primary resistance) .

MDR-TB is a great concern in the antibiotic resistance pandemic due to the high risk of death, because patients can remain infected for months or years, and due to the high risk of contracting XDR-TB . The Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance Global Project published by the WHO and the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease reviewing the global status of TB, those reports have pointed to an increasing incidence of drug-resistance TB in several countries in the world. The report includes data of 90,726 patients from 83 countries and the median prevalence of MDR-TB in new cases was 1.6% (interquartile range 0.6-3.9), ranging from 0%, in eight countries with low TB prevalence to 19.4% in Moldova and 22.3% in Baku, Azerbaijan. The median of MDR-TB among the patients previously treated, was 11.7% (interquartile range 4.9-20.9) and the highest proportion of MDR-TB was 60% in Tashkent, Uzbekistan . For TB control, monitoring the emergence of drug resistant strains and your early detection is essential for appropriate treatment to prevent the development of further resistance and the spread of resistant strains . Data of XDR-TB were rather incomplete, as 37 countries/territories only (mainly low-prevalence ones) reported representative data on XDR-TB in the period 2002-2007. In total, data were available for 3818 MDR-TB cases, of which 304 (8.0%) were XDR-TB .

Anti-TB drug resistance and particularly multiresistance, has been a subject of concern worldwide and is the result of the several factors related with programs for the TB control such as treatment regimen and patient adherence, study population, area endemicity, *M. tuberculosis* strain and others. Consequently, more than 450,000 MDR-TB cases are estimated to occur globally each year and a global surveillance of *M. tuberculosis* drug resistance has been proposed to guide appropriate treatment policies . In the last years, studies have shown that certain emerging *M. tuberculosis* strains, like Beijing/W and Haarlem strains families, induce more severe forms of TB, manifest higher failure/relapse than others, and they are strongly associated with drug resistance . The present occurrences of these strains in developed countries

emphasizes TB burden even in countries with good TB control programs and broaden the horizon for the elimination of this disease.

This steady increase in the frequency of *M. tuberculosis* strains resistant to one or more agents used in treatment and their diagnosis difficulty prompted us to review about the genetic basis of resistance against main drugs utilized in TB treatment. Firstly, because in order to control the drug resistance epidemic it is necessary to gain insight into how *M. tuberculosis* develops drug resistance. Secondly, because this knowledge will help us to understand how to prevent the occurrence of drug resistance and formulation of rapid and unambiguous strategies for detection of resistant strains, which is currently a slow and tedious process.

Isoniazid (INH)

INH, iso-nicotinic acid hydrazide, is a pro-drug that must be metabolized into iso-nicotinic acid by mycobacterial catalase-peroxidase hemoprotein (katG), encoded by the *katG* gene. The mode of action of INH has been the subject of intensive studies, but it is known to generate a range of highly reactive compounds, including reactive oxygen species (ROS) such as superoxide, peroxide and hydroxyl radical, nitric oxide, reactive organic species such as isonicotinic-acyl radical or anion, and certain electrophilic species, which then attack multiple targets in *M. tuberculosis*. This attack results in pleiotropic effects like the inhibition of protein and nucleic acid synthesis. Additionally, INH inhibits InhA, a nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-specific enoyl-acyl carries protein (ACP) reductase involved in fatty acid synthesis, resulting in the loss of acid-fastness, probably as a result of the inhibition of the synthesis of mycolic acids, the long-chained found in the cell wall. However, despite this progress about to understanding the action of INH, the exact mechanism(s) against *M. tuberculosis* remains to be fully delineated, as multiple targets and pathways have been considered (figure 1).

INH is the most used first-line anti-TB drug, and has been the cornerstone of all affective regimes for the treatments of TB disease and latent infection. *M. tuberculosis* is highly susceptible to INH (minimum inhibitory concentration [MIC] 0.02-0.2µg/ml) having the strongest early bactericidal activity against growing tubercle bacilli, but is not active against non-replicating bacilli or under anaerobic conditions. The isonicotinic acid hydrazide is most capable in preventing the emergence of bacillary resistance to companion drugs, but usually is the first drug that becomes resistant when a 6-month RMP-containing short-course regimen is applied.

INH resistance is the most common form of anti-TB drug resistance encountered, whether in isolation or in combination with other drugs. There are many points unexplained concerning the action of INH on *M. tuberculosis* yet. Although there are still about 10% to 25% of INH-resistant strains in which

neither of the known genes are affected by genetics modifications, it is known the most part of INH resistance is controlled by a complex genetic system that involves genes such as *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, and *ndh* . However, mutations in at least 16 other genes have been reported to be associated with INH resistance in clinical isolates .

Between 40 and 95% of INH resistant clinical isolates results from blocking pro-drug activation through deletions or frameshifts in *katG* gene that diminished or alter mycobacterial catalase-peroxidase activity, resulting in high levels of INH resistance . Most mutations are found in region comprising codons 138 and 328, with the most commonly observed gene alteration (75 to 90% frequency) being at codon 315 of the *katG* gene . The substitution of a single nucleotide at position 315 of *katG* (S315T), vary from 53% to 96% of INH resistant isolates. Beijing family isolates from several countries usually carry a higher percentage of the *katG* S315T shift compared to non-Beijing family isolates . This mutations may be favored because mutations at this location appear to decrease INH activation without abolishing catalase-peroxidase activity and, therefore, without diminishing the virulence or transmissibility of *M. tuberculosis* strains . The region of the genome within which *katG* lies appears to be relatively unstable and therefore susceptible to aforementioned alterations, possibly because of the presence of repetitive DNA sequences. This instability may contributed to the relatively high rates of generation of INH-resistant mutants, typically quoted as about 1 in 10^{5-6} organisms during in vitro selection .

Although the S315T mutation is the most common, genetic modification at the active site of bacterial catalase-peroxidase enzymes as well as the heme cofactor binding site have resulted in importantly effect on enzymatic function and thus isoniazid resistance . Mutations at codons V33Stop, D65E, D94A, G99E, H108E, N138S/H, S140A/N, D142A, L150A, S160L, A172T, T180C, V200Stop, F252L, T262R, P275T, Q294Stop, W299G, W328G, I335T, A350S, in *katG* gene have been also associated with high level of INH resistance .

M. tuberculosis may compensate for *katG* mutations by overexpressing the *ahpC* gene, that encodes alkyl-hydroperoxide reductase, protein involved in cellular regulation of oxidative stress capable of detoxifying damaging organic peroxides . Five different nucleotide alterations have been identified in the promoter region of *ahpC* which lead to overexpression of this protein in INH resistant isolates: -48 (G→A), -51(G→A), -54(C→T), -74(G→A) and -81(C→T) . Additionally, mutations within the *oxyR-ahpC* intergenic region that results in increased expression of alkyl hydroperoxidase reductase are also considered to compensate for peroxide sensitivity due to loss of *katG* function found in clinical resistant strains . Nevertheless, the correlation between polymorphic sites in the *oxyR-ahpC* region with INH resistance in *M. tuberculosis* requires further examination.

INH resistance may still be developed through alterations or overexpression of the INH drug target InhA that is encoded in an operon formed by *inhA* and *mabA* genes. The *inhA* (ORF) gene encode an

enoyl acyl carrier protein reductase which plays a role in the synthesis of mycolic acids, and it seems that a toxic derivative of INH inhibits directly the InhA protein binding to the InhA-NADH complex to form a ternary complex that results in inhibition of mycolic acid biosynthesis . Six point mutations associated with INH resistance within the structural *inhA* gene have been identified (I16T, I21T, I21V, I47T, V78A and I95P) although these mutations in the structural *inhA* gene are associated with INH resistance, it is known that just about 0 to 5% of INH *M. tuberculosis* clinical isolates have mutations at the ORF region . *InhA* promoter mutations are more frequently seen, about 8 to 20%, and are present at positions -24(G-T), -16(A-G), or -8(T-G/A) and -15(C-T) . This *inhA* promoter gene region regulates the expression of the enoyl acyl carrier protein reductase and those mutations may increase the level of protein expression . The overexpression of *inhA*, due to mutations in the *inhA* promoter region, leads to low level INH resistance and is accompanied by cross-resistance to the second-line anti-TB drug ethionamide (ETH) which has structural similarity to that of isoniazid .

Recently two other genes also involved in INH resistance, *kasA* and *ndh*, were found, but less frequency. The first, encodes a β -ketoacyl-ACP synthase (KasA) protein involved in the synthesis of meromycolic acids and its overexpression leads to resistance to INH at a MIC of 0.1 μ g/ml . Genotypic analysis of the *kasA* gene revealed 4 different amino acid substitutions involving codon 66 (GAT \rightarrow AAT), codon 121 (AGG \rightarrow AAG), codon 269 (GGT \rightarrow AGT), codon 312 (GGC \rightarrow AGC), codon 387 (GGC \rightarrow GAG) and codon 413 (TTC \rightarrow TTA) . Although similar mutations were also found in INH susceptible isolates the possibility of *kasA* constituting an additional resistance mechanism should not be excluded .

Mutations in *ndh*, a gene encoding an NADH dehydrogenase that is bound to the active site of *inhA* to form the ternary complex with activated INH , were recently found to confer resistance to INH and ETH in *M. bovis*. The *ndh* mutants had altered NADH/NAD ratios, causing defects in the enzymatic activity. Thus, defects in the oxidation of NADH to NAD results in NADH accumulation and NAD depletion which appears to protect them from INH-mediated toxicity since these high levels of NADH can then inhibit the binding of the INH-NAD adduct to the active site of the InhA enzyme . About 9.5% of INH resistant samples showed point mutations in the *ndh* gene at codons 110 and 168 and these mutations were not detectable in the INH susceptible group .

Studies of mutations associated with INH resistance have been limited because of the variety of genes involved; the number of isolates evaluated; and absence of correlation with *in vitro* INH levels determined by minimal inhibitory concentration. Dalla Costa and colleagues characterized mutations in *katG*, *ahpC* and *inhA* (ORF and regulatory regions) gene loci from 224 INH resistant *M. tuberculosis* isolates in countries in South America. Among these, the *katG* gene was the most frequently mutated (80.8%; 181/224). The mutation in codon 315 of the *katG* gene was present in 178 isolates, comparable to

the previously reported rate for patients diagnosed in Kuwait, Brazil and The Netherlands (65% and 55%, respectively), but lower than described in Russia . Mutations in *inhA* regulatory region were the second most frequently (9.8%), following by *ahpC* gene (8.9%), and *inhA* ORF region (1.3%).

Rifampin (RMP)

RNA polymerase (RNAP) is a crucial enzyme in the transcriptional process and is the final target for regulatory pathways controlling gene expression in all living organisms. In bacteria, RNAP is responsible for synthesizing mRNA, rRNA and tRNA . The 400 KDa RNAP core enzyme consists of five different subunits, including an α -dimer (α_2), β subunit, β' subunit and ω subunit. These subunits are converted to a holoenzyme following the binding of one σ subunit, which initiates transcription from promoters . The genes encoding subunits α , β , β' , ω and σ have been designated *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoZ* and *rpoD*, respectively .

RMP was introduced for use in anti-tuberculosis therapy in the early 1970s and is a very important first line drug treatment of TB. RMP is bactericidal because inhibits the essential *rpoB* gene product β -subunit of DNA-dependent RNA polymerase activity of bacterial but not of mammalian origin, acting early in transcription. It is thought to bind to the β subunit, close to the RNA/DNA channel, and physically blocks the elongation of the growing RNA chain after 2-3 nucleotides have been added. In *M. tuberculosis* the bactericidal action has been identified from generating of apoptosis via activation of the “suicide gene module” *mazEF* .

RMP is one of the most potent anti-tuberculosis drugs. More than 90% of RMP-resistant TB-causing isolates are also resistant to INH, and RMP resistance is therefore a valuable surrogate marker for MDR-TB . RMP is bactericidal for *M. tuberculosis*, and is active against both growing and stationary phase bacilli with low metabolic activity, with MICs ranging from 0.05 to 1 $\mu\text{g/ml}$ on solid or liquid media, but the MICs is higher in egg media (MIC=2.5-10 $\mu\text{g/ml}$). Strains with MICs $< 1\mu\text{g/ml}$ in liquid or agar medium or MICs $< 40\mu\text{g/ml}$ in Lowenstein-Jensen (LJ) medium are considered RMP-susceptible .

Resistance to RMP occurs at a low frequency, 10^{-7} to 10^{-8} , because of this RMP monoresistance in *M. tuberculosis* is rare, except perhaps in HIV-infected patients . Extensive studies on the *rpoB* gene in RMP resistant isolates of *M. tuberculosis* identified a variety of mutations and short deletions in the gene. Since 1993 when Telenti and colleagues cloned and sequenced the core region of the *M. tuberculosis* *rpoB* gene a large number of mutations have been reported from strains isolated in many countries worldwide . As in other bacteria, mutations in a small defined hot-spot region of the 81base pair (bp) of the *rpoB* gene (codons 432 to 458 in *M. tuberculosis* and 507 to 533 in *Escherichia coli*, named cluster I),

termed the rifampicin-resistance determining region (RRDR), are found in about 94-98% of RMP-resistant *M. tuberculosis* isolates (figure 2) . About 69 single nucleotide changes; 3 insertions, 16 deletions and 38 multiple nucleotide changes have been reported in this region . However, Herrera et al. and other authors have detected mutations, associated with RMP resistance, outside the 81-bp-core region such as at the codons 481, 490, 498, 505, 534, 535, 553, 561, 571, 572, 633, and 672, although less frequently.

Both clinical and laboratory derived mutants are seen around amino acids 513-531, generally resulting in high level resistance (MIC[>] 32µg/ml) . Mutations at positions 531, 526 and 516 are among the most frequent mutations in RMP-resistant strains . Siddiqi and colleagues , analyzed 93 RMP-resistant isolates from India, of these, 28 had missense mutation S531L and 8 had the substitution S531W. The next most common mutations among those isolates were the amino acid substitutions D516V or D516G (20 isolates) and H526Y, H526L, or H526R (19 isolates). In this study, the amino acids 526 to 531 appear to be very important in drug target interactions, and mutations in them result in MICs in the range of 64µg/ml and above.

However, the frequency and nature of mutations in the *rpoB* gene among RMP-resistant *M. tuberculosis* strains vary considerably according to the geographical location or the ethnic populations . Kapur and colleagues , examined US strains collection and found strains with a CAC→TAC codon 526 change (H→Y) accounted for about 30%, while organisms with this mutation represented only 12% of the samples from nine countries studied by Telenti et al. . In addition, mutations in codon 533 have been reported for RMP-resistant and RMP-susceptible strains by Taniguchi et al. , however, in studies conducted with isolates from same regions in Brazil and France, this mutation was strongly involved with RMP resistance .

Pyrazinamide (PZA)

PZA is an important first-line drug used along with INH and RMP and plays an essential role in TB treatment because kills a population of latent bacilli in acidic pH environment in the lesions that is not killed by other drugs . PZA has high sterilizing activity in vivo , but no activity against tubercle bacilli at normal culture conditions near neutral pH, since PZA is only active against *M. tuberculosis* at acid pH (e.g 5.5) . Even at acid pH, PZA activity is quite poor, with MICs in the range of 6.25-50µg/ml. PZA activity is enhanced under low oxygen or anaerobic conditions and by agents that compromise the energy status, such as weak acids , and energy inhibitors such as DCCD (dicyclohexylcarbodiimide), azide and rotenone .

The mechanism of action of PZA is poorly understood, it is known that PZA is a pro-drug that enters the organism through passive diffusion and requires conversion to its active form, pyrazinoic acid

(POA), by the pyrazinamidase/nicotinamidase enzyme encoded by *pncA* gene of *M. tuberculosis*. PZA-susceptible *M. tuberculosis* isolates possess a pyrazinamidase (PZAse) that is constitutively expressed and hydrolyzes PZA to POA which is the lethal molecule inhibiting various functions at acid pH in *M. tuberculosis*. The POA produced intracellularly reaches the cell surfaces through passive diffusion and a defective efflux. The accumulation of POA and protonated POA lowers the intracellular pH to a suboptimal level that may inactivate many pathways including fatty acid synthase and membrane transport function. The protonated POA brings protons into cell and could eventually cause cytoplasmic acidification and de-energize the membrane by collapsing the proton motive force, which affects membrane transport. The target of PZA is related to membrane energy metabolism, however, it is widely accepted that POA may not have a specific target, but rather that cellular acidification causes inhibition of major processes.

PZA-resistant *M. tuberculosis* strains lack PZAse activity and mutations in the *pncA* gene is known to be associated with this resistance. Several authors have reported that 72% to 95% of PZA-resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* carried *pncA* mutations and these mutations are unusually located spread throughout the gene, although there are three areas of clustered mutations around amino acids 3-71, 61-85 and 132-142. Studies have reported that the alignment of the amino acid sequences of PZAases from various species reveals that this region contains highly conserved residues, supporting the idea that this region should be structurally and/or catalytically important for the PZAse activity. A small number of PZA mutations occur outside the *pncA* gene but these have not been characterized.

Ethambutol (EMB)

EMB [(+)-2,2'-(ethylenediimino)di-1-butanol] is one of the primary drugs used in combination with INH, RMP and PZA to prevent the emergence of drug resistance. EMB is a bacteriostatic agent that is active for growing bacilli and has no effect on non-replicating bacilli. Although several hypotheses have been proposed to explain the mechanism of action of EMB, most studies have implicated a detrimental alteration of the mycobacterial cell wall structure through the inhibiting the polymerization of cell wall arabinan of arabinogalactan and of lipoarabinomannan and induces the accumulation of D-arabinofuranosyl-P-decaprenol, an intermediate in arabinan biosynthesis. Arabinosyl transferase, encoded by *embB*, an enzyme involved in the synthesis of arabinogalactan, has been proposed as the target of EMB in *M. tuberculosis* and *M. avium*. In *M. tuberculosis*, *embB* is organized into a 10-kb operon with *embC* and *embA* genes named *embCAB*. Mutations in *embCAB* operon, in particular *embB*, are responsible for EMB resistance. Mutations at *embCAB* resulted in MICs of 7.5-50µg/ml and mutations at codon 306 in *embB* is one of the most common (>68%) in *M. tuberculosis*, making it the ethambutol resistance

determining region (ERDR) , in particular M306 which is often replaced by isoleucine, leucine or valine . However, about 35% of EMB-resistant strains do not have *embB* mutations , suggesting that there may be others mechanisms of EMB resistance.

Studies conducted by Sreevatsan and colleagues comparing EMB-resistant versus EMB susceptible *M. tuberculosis* strains showed there is restricted variation in *embCAB* in natural populations of *M. tuberculosis* recovered from diverse geographic sources and there is a unique and common association of EmbB amino acid residue 306 substitutions in EMB resistance. They found five distinct mutants codons resulting in three different amino acid replacements at EmbB position 306 of EMB-resistant organisms and concluded that these mutants have arisen by positive Darwinian selection in the course of drug therapy.

Streptomycin (STR)

STR is an aminocyclitol glycoside utilized as alternative first line anti-TB drug recommended by the WHO . The effect of STR has been demonstrated to take place at the ribosomal level having activity against a variety of bacterial species . The STR binds to the 30S subunit of bacterial ribosome interacting with the 16S rRNA and S12 ribosomal protein (*rrs* and *rpsL* genes, respectively) , inducing ribosomal changes, which cause misreading of the mRNA and inhibition of protein synthesis . STR kills actively growing tubercle bacilli with MICs of 2-4µg/ml , but it is inactive against non-growing or intracellular bacilli .

STR is the least toxic of the aminoglycosides utilized for TB, but resistance development is unacceptably rapid . *M. tuberculosis* becomes resistant when targets of STR in the ribosomes are mutated. Point mutations in STR resistant isolates have been reported to both *rpsL* and *rrs* genes, and these are the major mechanism of STR resistance, accounting for 65-67% of STR-resistant strains . The most frequently observed mutations in *rpsL* gene are at codon 43 (AAG→AGG/ACG; K→R/T) and at codon 88 (AAG→AGG/CAG; K→R/Q), being reported in 50% of STR-resistant strains . *M. tuberculosis* has only a single copy of the *rrs* gene, which encode the 16SrRNA. Thus, the loop of 16S rRNA that interact with S12 protein constitute an easily selected mutation site . The 530 loop region is part of the aminoacyl-tRNA binding site and is involved in the decoding process and mutations are clustered in this region as well in the adjacent 915 region . About 20% of STR resistant has a C→T transitions at positions 491, 512 and 516, and a A→C/T transitions at positions 513 in that highly conserved 530 loop .

MIC analysis of STR resistant isolates indicate that amino acid replacements in the *rpsL* genes correlate with a high level of resistance, whereas mutations in the *rrs* gene correlate with an intermediate

level and altered cell permeability or mutations which lie outside of these genes have been related with low level of STR resistance .

Second line drugs

RMP, EMB and PZA –containing short-course chemotherapy remains efficacious in the treatment of INH resistant strains, but its efficacy becomes substantially compromised in the treatment of MDR-TB, denoted by bacillary resistance to at least both INH and RMP. However, MDR-TB is not incurable. According to the WHO, for those strains that are MDR-TB must be used second line drugs such as: aminoglycosides (kanamycin and amikacin), polypeptides (capreomicin, viomycin and enviomycin), fluoroquinolones (FQs-ofloxacin, ciprofloxacin, and gatifloxacin), D-cycloserine and thionamides (ethionamide and prothionamide). Unfortunately, these second-line drugs are inherently more toxic and less effective than first-line drugs and since March 2006, when a report jointly published by the US Centers for Disease Control and Prevention and the WHO described a severe form of disease, XDR-TB (extensively drug resistance TB) , presently defined as MDR-TB with additional bacillary resistance to any FQs and at least one of second-line injectable drugs . The phenotypic methods to detect resistance to second line drugs are less well established and the molecular mechanisms of resistance are also less defined .

Levofloxacin (LVF) and ofloxacin (OFL) are the two FQs used as second-line drugs in MDR-TB treatment . FQs inhibits DNA gyrase (topoisomerase II) and topoisomerase IV, two essential enzymes responsible for maintaining chromosomes in an appropriated topological state, resulting in microbial death . DNA gyrase is a tetrameric A₂B₂ protein. The A subunit carries the breakage-reunion active site, whereas the B subunit promotes adenosine triphosphate hydrolysis. *M. tuberculosis* has *gyrA* and *gyrB* encoding the A and B subunits, respectively, which has conserved region, the quinolone-resistance-determining region (QRDR) with 320 bp and 375 bp respectively. These are points of interaction of FQ and gyrase , and mutations in *gyrA* are associated with high-level resistance while *gyrB* mutations have been just identified in laboratory mutants of *M. tuberculosis* . However, the percentage of FQs resistant *M. tuberculosis* clinical isolates with detectable *gyr* mutations may vary from 2% to 100% among different studies . This variance can be explained by the differences in the extension of coverage of the genome ; the definition of MICs ; and maybe, others mechanisms responsible for the mycobacterial resistance to FQs, such as decrease cell-wall permeability to drug, drug efflux pump, drug sequestration, or perhaps even drug activation . In the least years, a new mechanism of FQs resistance related with MfpA was reported, a member of the pentapeptide repeat family of proteins from *M. tuberculosis*, by binding to

DNA gyrase and inhibition of its activity . However, this alternative mechanisms is related with lower levels of resistance, unlike that due to *gyr* mutations .

Kanamycin (KM) and its derivative amikacin (AMK), are also aminoglycosides inhibitors of protein synthesis, like STR, through modification of ribosomal structures at the 16S rRNA and can not be used against dormant bacillus . Aminoglycosides bind to bacterial ribosomes and disturb the elongation of the peptide chain in the bacteria . Ribosomal changes in the 16S rRNA lead to possible cross-resistance with STR, KM and AMK, but this is no always complete, because KM and AMK were still efficacious *in vitro* when resistance to STR had developed . Mutations at positions 1400, 1401 and 1483 of the *rrs* gene (16S rRNA) are associated with resistance to KM and AMK .

Viomycin (VM) and capreomycin (CPM) are polypeptide antibiotics that the mode of action is not fully understood, but it is known that inhibit prokaryotic protein synthesis and are also used as second-line anti-TB drug. As this drugs have such potent activity against the persistent forms of TB, they may have a target or secondary target outside the ribosome . The rRNA methyltransferase, encoded by *tlyA* gene, was shown to be involved in resistance to CPM and VM . This rRNA methyltransferase modifies nucleotide C1409 in helix 44 of 16S rRNA and nucleotide C1920 in helix 69 of 23S rRNA . Additionally, mutations in the *rrs* gene that encodes the 16S rRNA is also associated with resistance to VM and CPM, specifically a G→T nucleotide changes at codon 1484 . Cross-resistance can be found between KM, AMK, CPM and VM .

Ethionamide (ETH) is an important drug in the treatment of MDR-TB and is mechanistically and structurally analogous to INH. Like INH, ETH is also thought to be a prodrug . However, ETH is activated by a *katG*-independent mechanism leading to the forming of an S-oxide metabolite that has considerably more activity than the parent drug. Same studies have reported that *ethA* (also called *etaA*), which codes for a flavin mono-oxygenase, is responsible for activation of ETH . The mode of action of the activated form of ETH is via inhibition of the *inhA* gene product enoyl-ACP reductase . The activated drug disrupts cell wall biosynthesis by inhibiting mycolic acid synthesis . Mutations in the promoter of the *inhA* and *ethA* genes are associated with resistance to ETH . As the enzymes responsible for ETH activation is different to INH activation, only mutants derived from alterations of the gene *inhA* do show cross-resistance between INH and ETH .

D-cycloserine (DCS) is a cyclic analog of amino acid D-alanine which is one of the central molecules of the cross linking step of peptidoglycan assembly . DCS inhibits alanine racemase (Alr) and D-alanine:D-alanine ligase (Ddl) which synthesizes the pentapeptide core using D-alanine; both enzymes are essential in the synthesis of peptidoglycan and subsequently in cell-wall biosynthesis and maintenance . Over expression of *alr*, specifically due to a G→T transversion in the promoter region, cause DCS resistance .

Conclusions

According to Cohen et al. there are three determinants that influence the proportion of drug-resistant TB among all cases in a population-based study. First, the size of the subpopulations infected with susceptible strains and the probability of developing TB among those infected with susceptible strains. Second, the size of the subpopulation infected with drug-resistant strains and the probability of developing TB among those infected with resistant strains. Both are related with the risk of infection as well as the immunity of the infection population in containing the infection; The least determinant, strongly associated with the interaction between the bacillary population and the treatment regimen, is the emergence of drug-resistant strains during the treatment among TB patients initially infected with susceptible strains and that with the amplification of drug resistance among those initially infected with resistant strains.

A real molecular understanding of the series of events that render *M. tuberculosis* multi-drug resistant remains elusive. However, for TB control, monitoring the emergence of drug resistant strains is essential. While detection of drug resistance by phenotype is hindered by the prolonged time to identify resistant strains, genotypic prediction of drug resistance is faster .

It is necessary to efficiently interrupt the MDR and XDR-TB ongoing transmission through early diagnosis and effective treatment that should be a priority target for TB control. Several options of rapid testing of anti-TB drug resistance are available, including DNA sequencing , solid-phase hybridization techniques , microscopic observation drug susceptibility assay , real-time PCR techniques, microarrays , slide DST , phage-based assays , colorimetric methods and nitrate reductase assay . Additionally, RMP resistance has been proposed as molecular marker for MDR-TB. Detecting RMP resistance as a screening strategy in the diagnosis of MDR-TB needs to be tested in settings with a low risk of non-MDR RMP resistance .

Further, the diagnosis of latent TB infection specifically caused by drug-resistant strains is currently not possible. Yet, early diagnosis and exact identification of drug resistance during *M. tuberculosis* latency could have a substantial impact on TB control . These and several others factors must be reviewed and analyzed to find a fast and effective form to control TB and the drug-resistant strains emergency. The molecular techniques may be the most promissory tool for this.

References

