



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**NITRATASE DIRETA: UM MÉTODO NÃO COMERCIAL COMO FERRAMENTA PARA  
O CONTROLE DA TUBERCULOSE MDR E XDR**

**FERNANDA DE SOUZA ABILLEIRA**

Rio Grande, maio de 2012



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**NITRATASE DIRETA: UM MÉTODO NÃO COMERCIAL COMO FERRAMENTA PARA  
O CONTROLE DA TUBERCULOSE MDR E XDR**

**FERNANDA DE SOUZA ABILLEIRA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva

Rio Grande, maio de 2012

**Fernanda de Souza Abilleira**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

**NITRATASE DIRETA: UM MÉTODO NÃO COMERCIAL COMO FERRAMENTA  
PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE MDR E XDR**

Banca Examinadora:

---

Dr<sup>a</sup>. Elis Regina Dalla Costa

---

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Sá Spies

---

Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva, pelos ensinamentos, pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo, por ter respeitado e entendido meus momentos e principalmente pela paciência durante os últimos meses da escrita desta dissertação. Agradeço também pelas oportunidades oferecidas nesta caminhada, que certamente foram fundamentais para o meu aprimoramento pessoal e profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea von Groll pelo profissionalismo, incentivo, dedicação, paciência e bom humor.

Ao Dr. Juan Carlos Palomino e Dr<sup>a</sup>. Anandi Martin por terem aberto as portas do seu laboratório para que eu realizasse toda a parte experimental deste trabalho, pela oportunidade concedida, por acreditarem no meu trabalho, pela disponibilidade e ajuda constante durante a pesquisa, por terem feito eu me sentir em casa na Bélgica e principalmente por todo o carinho e incentivo.

A minha amiga Lídice, pelo abrigo, caronas, eterno bom humor, ajuda estatística e epidemiológica, por estar sempre presente, mesmo quando era praticamente impossível. Mais do que uma amiga, és a irmã que eu escolhi. Obrigada ao Marlos também que foi obrigado a conviver comigo devido a generosidade da sua irmã.

Aos meus pais, Eduardo e Maria da Graça, pelos ensinamentos de toda a vida, por nunca terem medido esforços para que eu realizasse meus sonhos, pelo constante estímulo, amor e compreensão.

A minha avó Haydée, que esteve presente em todos os momentos de minha vida, me incentivando e acreditando em mim quando eu mesma já não acreditava mais.

A todos os pesquisadores e técnicos que conheci no Instituto de Medicina Tropical da Antuérpia pelo companheirismo, colaboração, carinho, momentos de descontração, por terem me apresentado e acolhido no seu país e principalmente por terem diminuído a distância de casa. Em especial ao Florian, Robbert, Ivan, Francesca e Elisa pelos jantares, happy-hours, viagens e infindáveis risadas no laboratório e fora dele.

Ao Jan por ter me recebido em sua casa, pelas agradáveis conversas no café da manhã, pelos excelentes jantares e por me ensinar um pouquinho da cultura belga.

Ao Adolfo por ter sido sempre presente, pelo apoio incondicional, pelo companheirismo, carinho, idéias e conselhos criativos e por ser parte fundamental da minha vida.

A Ana Bárbara pela colaboração, pela amizade, pelas longas conversas e pelos

momentos divertidos que passamos juntas.

A Camila, Luísa e Bianca por terem sido meus braços direito e esquerdo durante o piloto deste projeto, por toparem o desafio, pela dedicação, disponibilidade e por terem sido as melhores estagiárias que alguém poderia querer.

A minha amiga Clarice por todo apoio, pela ajuda técnica, por ter sempre uma palavra de incentivo, por estar do meu lado nos bons e maus momentos, traduzindo o verdadeiro significado da palavra amizade. Devo agradecer também pela nossa hilária parceria, pelos ataques de riso e acontecimentos únicos. Te concentra gurial!

A Fê por todo o auxílio, apoio, ensinamentos e disponibilidade durante a construção dessa dissertação.

A Ivy pelos ensinamentos moleculares, pelas caronas para Pelotas, pela excelente companhia, pelas conversas, por estar sempre disposta a ajudar e por contagiar a todos com sua organização.

A Jeane, Júlia, Sheylla e Catiúcia pelas conversas, pelos momentos de bancada, de descontração, pelas viagens e demais momentos agradáveis que passamos juntas.

A Jéssica pela paciente ajuda com os cálculos, pela colaboração, incentivo, conselhos e apoio. Obrigada por não ter desistido de mim e ter me puxado as orelhas quando eu precisava.

A Lilli por estar sempre disposta a ajudar, pelo carinho, por sempre achar uma solução para tudo, pelos excelentes jantares e pelas conversas hilárias que sempre tivemos.

A Maíra, que ao contrário da lógica, aproximou-se de mim pela distância, por ter sempre me escutado como se fosse a primeira vez, por toda a amizade, conselhos, pela companhia virtual e física, por sempre acreditar em mim e por toda a ajuda durante essa caminhada.

A Mari por ter me iniciado no mundo da pesquisa da tuberculose, por ter explicado tudo com tanta paciência e por estar sempre disposta a ajudar.

Ao Michel e ao Lande por supervisionarem meus textos moleculares e estatísticos.

A Renata por ter sempre segurado as pontas quando eu precisava me ausentar do laboratório, pelo carinho e apoio mesmo estando longe.

Ao Rubens pela ajuda técnica, pelo carinho, conselhos e por mostrar-se sempre disponível.

A Tati por ser sempre tão carinhosa, por explicar tudo com extrema paciência, pela gentileza, atenção e generosidade.

As minhas filhas, Alenka e Foca pelo amor incondicional, por me lembrarem dia a dia o porquê de ter escolhido esta profissão e por suportarem a distância, sempre me recebendo com latidos e miados esfuziantes ao voltar pra casa.

Aos demais amigos, colegas e a todos aqueles que ajudarem a realização desta dissertação, o meu mais sincero obrigado!

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

Theodore Roosevelt

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desenho esquemático da placa de DNRA .....	50
<b>Figura 2.</b> Exemplo de DNRA em placa .....	52
<b>Figura 3.</b> Gráfico de percentual cumulativo de resultados positivos pelos métodos da DNRA em placas e MP.....	52

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Sensibilidade e especificidade do teste de suscetibilidade direta em 84 amostras de escarro pelos métodos da nitratase e das proporções .....53

**Tabela 2.** Concordância dos resultados dos testes de suscetibilidade direta em 84 amostras de escarro pelos métodos da nitratase em placas e em tubos .....54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
- AMI - Amicacina
- BCG – Bacilo Calmette-Guérin
- CAN - Canamicina
- CAP - Capreomicina
- CMI – Concentração Mínima Inibitória
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- EMB - Etambutol
- HIV – Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- INH – Isoniazida
- MDR – Multidroga resistente
- MIC- Minimum Inhibitory Concentration
- MTT - 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
- NRA - Nitrate Reductase Assay
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- pb - pares de bases
- PAS - Ácido paramino-salicílico
- PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
- PNCT - Programa Nacional de Controle da Tuberculose
- PZA – Pirazinamida
- REMA - Resazurin Microtitre Assay (Ensaio da Microdiluição utilizando Resazurina)
- RMP - Rifampicina
- RNA -Ácido Ribonucléico
- SINAN - Sistema de Informação e Agravos de Notificação
- SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism
- STR – Estreptomicina
- TB – Tuberculose
- TDO - Tratamento Diretamente Observado
- TDR - Resistente a Todos os Antibióticos
- XDR – Extensively Drug Resistant (Extensivamente Resistente às Drogas)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA .....	1
1.1. Histórico .....	1
1.2. Epidemiologia e Considerações.....	3
1.3. Agente etiológico.....	6
1.4. Transmissão .....	7
1.5. Diagnóstico.....	8
1.6. Tratamento .....	9
1.7. Resistência.....	10
1.8. Determinação do perfil de sensibilidade.....	15
1.8.1. Métodos genotípicos.....	16
1.8.1.1. Sequenciamento .....	17
1.8.1.2. PCR-SSCP .....	17
1.8.1.3. DNA Microarrays .....	18
1.8.1.4. Imno-LIPA Rif TB.....	19
1.8.1.5. Xpert MTB/RIF .....	19
1.8.1.6. Genotype MTBDR .....	20
1.8.2 Métodos fenotípicos.....	21
1.8.2.1. Método das proporções .....	22
1.8.2.2. BACTEC TB 460.....	23
1.8.2.3. BACTEC MGIT 960 .....	23

1.8.2.4. MODS .....	24
1.8.2.5. D29-Phage Assay .....	25
1.8.2.6. Método de detecção de microcolônias - Thin layer.....	25
1.8.2.7. E-test - Epsilon .....	25
1.8.2.3. Alamar blue assay .....	26
1.8.2.4. Brometo de tetrazólio (MTT) .....	26
1.8.2.5. Resazurina.....	26
1.8.2.6. Nitrate reductase assay (NRA) .....	27
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
3. ARTIGO .....	45
4. CONCLUSÕES.....	63
ANEXO .....	65

# 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1. Histórico

A tuberculose (TB) é uma enfermidade contagiosa, causada por uma bactéria álcool-ácido resistente, denominada *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch, que acomete a humanidade há milhares de anos (Barroso *et al.*, 2004). Acredita-se que seu surgimento data de 5000 a.C., quando o homem domesticou o gado e estabeleceu modificações ambientais que propiciaram as condições adequadas para o aparecimento de algumas enfermidades infecciosas. Acredita-se que o ancestral do bacilo causador da doença tenha passado dos bovinos ou caprinos, para o homem (Taylor *et al.*, 1999; Gómez i Prat & Souza, 2003; Daniel, 2006).

A existência da TB na era pré-colombiana foi inicialmente sugerida por deformidades compatíveis com TB óssea encontrada em esqueletos de pessoas que viveram na região de Ohio em 1275 e confirmada a partir da detecção de DNA de *M. tuberculosis* em lesões pulmonares típicas da TB encontradas em múmias do Peru que datam de 1000 d.C. (Silva *et al.*, 2003).

Jean Antonie Villemin, em 1865, demonstrou formalmente que a TB era uma doença contagiosa (Beck, 2000). Em 1882, o microbiologista alemão Robert Koch publicou um artigo que fazia referência ao descobrimento de Villemin, onde descreveu o agente etiológico da TB (Koch, 1882).

A propriedade do bacilo da TB em resistir à descoloração por uma solução de álcool-ácido foi descoberta por Paul Ehrlich em 1882. O pesquisador propôs um método de coloração que mais tarde foi melhorado por Franz Ziehl e novamente modificado por Friedrich Neelsen, resultando no método de coloração conhecido por Ziehl-Neelsen (Beck, 2000). Essa técnica é um método laboratorial que ainda é usado para o diagnóstico da TB (Silva *et al.*, 2003).

1           Em 1908, Albert Calmette e Camille Guérin desenvolveram uma  
2 vacina contra TB, a BCG (Bacille Calmette-Guérin), cultivando um tipo  
3 patogênico do *Mycobacterium bovis* isolado de um bovino com TB. A  
4 micobactéria foi cultivada em batata glicerinada, meio prevalente na época.  
5 Em 1920, após 232 passagens realizadas a cada três semanas por um  
6 período de 13 anos (entre 1908 e 1921), o microrganismo atenuado foi  
7 injetado em animais e assim identificado seu poder vacinal (Cole *et al.*,  
8 2005).

9  
10           A partir da década de 40, começou a utilização de fármacos anti-TB:  
11 estreptomicina (SMR) em 1948, ácido paramino-salicílico (PAS) em 1949 e  
12 isoniazida (INH) em 1952. Esquemas terapêuticos padronizados foram  
13 efetivamente utilizados a partir da década de 60 (Ruffino-Netto, 2002), com  
14 subseqüentes descobertas da pirazinamida (PZA), rifampicina (RMP) e  
15 etambutol (EMB), que deram à comunidade médica as ferramentas básicas  
16 para o controle da TB (Gillespie, 2002).

17  
18           Até meados do século XX, vários fatores contribuíram para o declínio  
19 global da TB, dentre eles: a intensa utilização do raio-X, o desenvolvimento  
20 da quimioterapia, o programa de imunização com BCG, melhoria nas  
21 condições socioeconômicas e a pasteurização do leite. O recrudescimento  
22 no número de casos ao final do século XX, mesmo em regiões  
23 economicamente desenvolvidas, culminou em 1993 com a declaração pela  
24 Organização Mundial da Saúde (OMS) de que a TB passava a ser uma  
25 emergência global (Taylor *et al.*, 2003). Muitos fatores contribuíram para  
26 esse aumento, podendo destacar-se a epidemia do vírus da  
27 Imunodeficiência Adquirida (HIV), o crescimento da pobreza em áreas  
28 metropolitanas e o aumento da imigração (Raviglione, 2003). É importante  
29 salientar que a TB nunca deixou de ser um problema de saúde pública nas  
30 regiões em desenvolvimento, onde as condições socioeconômicas são,  
31 muitas vezes, piores do que aquelas observadas na Europa do século XIX  
32 (Silva *et al.*, 2003).

## 1.2. Epidemiologia e Considerações

A TB é considerada ainda hoje uma das doenças infecciosas mais disseminadas ao redor do mundo (com cerca de nove milhões de novos casos notificados anualmente) e a principal causa de morte em adultos por infecção devido a um só agente causal, sendo que a maior parte dos casos ocorre em países em desenvolvimento (Cosivi, 1998; WHO, 2008a).

Com a declaração da TB como emergência global em 1993, a OMS solicitou a todos os países para focarem suas taxas de cura em 85% e expandirem seus serviços para detectar mais casos de TB. Em 1994, foram lançados cinco elementos essenciais para o controle da TB: 1) comprometimento governamental - com fortalecimento de recursos humanos e garantia de recursos financeiros, elaboração de planos de ação e mobilização social; 2) diagnóstico de casos por meio de exames bacteriológicos de qualidade; 3) padronização e implantação da quimioterapia de curto tempo; 4) implantação da estratégia do tratamento diretamente observado (TDO); 5) fornecimento eficiente e gestão eficaz de medicamentos; 6) sistema de vigilância e avaliação ágil que possibilite o monitoramento dos casos, desde a notificação até o encerramento do caso (Raviglione, 2003).

Em 2006, a estratégia STOP-TB/OMS foi lançada visando o alcance das metas globais, apresentando seis componentes, sendo que a estratégia TDO continuava como ação central. São eles: 1) buscar a expansão e o aperfeiçoamento da qualidade da estratégia TDO; 2) tratar a coinfeção TB/HIV, a MDR-TB (TB multidroga resistente) assim como as pessoas privadas de liberdade, refugiados, pessoas vivendo em situação de rua e outras populações mais vulneráveis; 3) contribuir para o fortalecimento do Sistema de Saúde, participar ativamente nos esforços para melhorar as políticas de saúde, recursos humanos, financiamento, gestão, de atenção e sistemas de informação; 4) envolver todos os provedores da saúde; 5) empoderar portadores de TB e comunidades; 6) capacitar e promover a pesquisa:

1 operacionais, de novos meios diagnósticos, de medicamentos e vacinas (Brasil,  
2 2010).

3

4 Este conjunto de ações tem resultado por diminuir o número de casos  
5 absolutos de TB, assim como as taxas de incidência, ao invés de subir  
6 lentamente, como previa-se que fosse ocorrer (WHO, 2011).

7

8 Em 2010, foi estimado 12 milhões de casos prevalentes de TB, o  
9 equivalente a 178 casos por 100.000 habitantes. Neste mesmo ano, havia  
10 aproximadamente 8,8 milhões de casos incidentes de TB, o equivalente a 128  
11 casos/100.000 habitantes, incluindo 1,1 milhões mortes em HIV negativos e  
12 350 mil mortes em HIV positivos. Casos de isolados resistentes a uma das  
13 drogas utilizadas no tratamento têm sido relatados em todos os países, e a  
14 taxa de TB multidroga-resistente é alta em alguns deles, especialmente  
15 àqueles pertencentes à antiga União Soviética e China (Onyebujoh & Rook,  
16 2004). A estimativa de MDR-TB em 2008 era de 440 mil casos, sendo que em  
17 2010, apenas 290 mil foram notificados oficialmente. Menos de 5% dos  
18 pacientes novos e previamente tratados foram testados para MDR-TB na  
19 maioria dos países. Embora o número de pacientes em tratamento tenha  
20 aumentado em 2010, chegando a alcançar 46 mil, isto significa apenas 16%  
21 do total de casos de MDR-TB notificados no mundo todo (WHO, 2011).

22

23 Até julho de 2010, 58 países e territórios notificaram pelo menos um  
24 caso de tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB) e países como Irã,  
25 Índia e Itália relataram casos de tuberculose resistente à todas as drogas  
26 (TDR-TB) (Migliori *et al.*, 2007, Velayati *et al.*, 2009, Udwadia *et al.*, 2001;  
27 WHO, 2011). A estimativa é que entre os anos de 2000 e 2020,  
28 aproximadamente um bilhão de pessoas estarão infectadas com o bacilo, 150  
29 milhões de indivíduos ficarão doentes e 36 milhões morrerão por TB  
30 (WHO,2004).

31

1           Em 22 países encontram-se 80% dos casos de TB estimados para o  
2 mundo, dentre os quais o Brasil ocupava o 10º lugar em 1997 (Ruffino-Neto,  
3 2002). Já, em 2010, o país passou a ocupar o 17º lugar nessa classificação  
4 (WHO, 2011).

5  
6           De acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de  
7 Notificação (SINAN) em 2011 foram notificados 81.570 novos casos de TB no  
8 Brasil. No Rio Grande do Sul 6.210 casos foram registrados em 2011 e, no  
9 mesmo ano, na cidade do Rio Grande-RS a notificação foi de 125 novos casos  
10 (Brasil, 2011).

11  
12           Em resumo, a estratégia para controle da TB fundamenta-se em quatro  
13 propostas comuns a quase todas as enfermidades infecciosas. A primeira é  
14 melhorar as condições de vida da população. A segunda é a implantação de  
15 programas de controle eficazes de enfermidades, que permitam identificar o  
16 maior número de casos, assim como estabelecer de imediato as medidas  
17 necessárias para curar o paciente e impedir a transmissão do bacilo (Silva, *et*  
18 *al.*, 2003)

19  
20           A vacinação é outro instrumento fundamental no controle das doenças  
21 infecciosas em geral, porém a BCG tem baixa eficácia e não confere efeito  
22 protetor total, inibindo, entretanto, as formas mais graves da TB (Barreto *et al.*,  
23 2006).

24  
25           O instrumento de maior eficácia para o controle da TB é a utilização de  
26 quimioterápicos administrados corretamente e o tratamento diferenciado para  
27 grupos específicos como os dependentes de álcool, e/ou outras drogas, os  
28 indigentes, os indígenas, os albergados, os prisioneiros, os portadores de HIV,  
29 os internados em asilos e orfanatos e aqueles infectados com cepas  
30 resistentes aos antimicrobianos (Natal, 2002).

31  
32           De acordo com Becerra e colaboradores (2000), o aumento de taxas,  
33 nos últimos anos, de cepas resistentes aos quimioterápicos disponíveis para

1 tratamento, agravou ainda mais o quadro da TB. Estima-se que 50 milhões de  
2 indivíduos estão infectados com cepas de *M. tuberculosis* resistentes e que o  
3 número de casos de TB causados por estas cepas pode estar subestimado.

4  
5 Considerando as características do bacilo, o escasso arsenal terapêutico  
6 disponível para tratar a TB e as reduzidas perspectivas da introdução de novos  
7 fármacos a médio prazo, o surgimento de TB causado por cepas resistentes e  
8 multirresistentes será uma volta ao passado com reduzidas alternativas para a  
9 cura (Becerra *et al.*, 2000).

### 10 11 **1.3.1. Agente etiológico**

12  
13 A TB é causada pelo *M. tuberculosis*, cujo gênero, *Mycobacterium*, é o  
14 único da família Mycobacteriaceae, da ordem Actinomycetales (Metchock, *et*.  
15 *al.*,1999). O *M. tuberculosis*, é um dos componentes do Complexo *M.*  
16 *tuberculosis*, junto a outros membros: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium*  
17 *tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, além da cepa  
18 vacinal *M. bovis* BCG. Tem sido proposta a inclusão de novas espécies, como  
19 *Mycobacterium canetti*, uma variante de *M. tuberculosis* encontrada na região  
20 da Somália, *Mycobacterium caprae*, agente etiológico de TB em caprinos e  
21 *Mycobacterium pinnipedii*, que causa TB em leões marinhos, mas que também  
22 pode infectar o homem. Destas espécies, as mais patogênicas para o homem  
23 são o *M. tuberculosis* e o *M. bovis* (Niero e Leão, 2004).

24  
25 A espécie *M. tuberculosis* é classificada como aeróbica estrita, parasita  
26 intracelular facultativo causador de patologia intracelular, não formador de  
27 esporos, sem flagelos, não produtor de toxinas. A parede celular é complexa e  
28 serve de proteção à ação de agentes químicos, embora seja destruído por  
29 agentes físicos, como calor e radiação ultravioleta. Fora do parasitismo só  
30 consegue sobreviver no meio externo por algumas horas. O *M. tuberculosis*  
31 divide-se a cada 18 a 32 horas dentro do macrófago. São resistentes ao álcool-  
32 ácido quando expostas à coloração tintorial pelo método de Ziehl-Neelsen ou  
33 Kinyoum, como citado anteriormente (Cole, 2005).

1           As micobactérias são bacilos ligeiramente curvados ou retos com 0.2 a  
2 0.6 µm por 1.0 a 10 µm de tamanho. A temperatura ótima de incubação do *M.*  
3 *tuberculosis* é de 35 a 37°C. Em meios de cultura sólidos, é necessária de 1 a  
4 3 semanas de incubação para que haja a formação de colônias (Metchock *et*  
5 *al.*, 1999, Cole, 2005). Sua parede tem baixa permeabilidade, já que possui  
6 uma estrutura e composição rica em lipídeos (De Rossi *et al.*, 2006).

7

8           O *M. tuberculosis* apresenta latência metabólica, permanecendo no  
9 interior do macrófago com metabolismo muito reduzido e sobrevivendo por  
10 anos no organismo humano. O estado de latência, no qual os bacilos  
11 permanecem dentro dos tecidos infectados, reflete uma redução no  
12 metabolismo resultante da ação da resposta imune celular, que reprime, mas  
13 não erradica a infecção (Cole *et al.*, 1998).

14

15           O genoma de *M. tuberculosis* H37Rv consiste de 4.411.532 pares de  
16 bases (pb), contém aproximadamente 4.000 genes e um conteúdo de Guanina  
17 + Citosina [G+C] de aproximadamente 65,5%, o qual é refletido na composição  
18 dos aminoácidos das proteínas. O conteúdo de G+C é constante em todo o  
19 genoma, indicando provável ausência de transferência horizontal de genes  
20 envolvidos com a patogenicidade (Cole *et al.*, 1998).

21

#### 22           **1.4. Transmissão**

23

24           O bacilo é transmitido pelo aerossol de pacientes com doença pulmonar  
25 ativa, quando um suficiente número de bactérias nas vias aéreas são expelidas  
26 através da respiração ou tosse, sendo que a inalação de poucos  
27 microrganismos pode causar a infecção (Onyebujoh & Rook, 2004). A  
28 probabilidade do bacilo ser transmitido depende de quatro fatores: 1) a carga  
29 bacteriana da pessoa com TB (o número de organismos expelidos no ar); 2) o  
30 ambiente no qual a exposição aconteceu; 3) a duração da exposição; 4) a  
31 virulência do organismo (CDC, 2000).

32

1 Em geral, pessoas com a infecção latente têm 5 a 10% de possibilidade  
2 de desenvolver a doença durante a vida com um maior risco dentro dos  
3 primeiros anos depois da infecção primária. Em algumas pessoas, *M.*  
4 *tuberculosis* supera as defesas do sistema imune e se multiplica, resultando na  
5 progressão da infecção para doença (Cole *et al.*, 1998; CDC, 2000).

6  
7 Dentre os grupos que tem o maior risco de desenvolverem a doença,  
8 podemos citar: indivíduos infectados com HIV com contato próximo aos casos  
9 bacilíferos, crianças com menos de cinco anos de idade, portadores de  
10 doenças crônicas, indígenas, moradores de rua, prisioneiros e indivíduos que  
11 recebem tratamento com medicamentos imunodepressores (van Soolingen *et*  
12 *al.*, 1997, Warren *et al.*, 2006).

13  
14 As características clínicas comuns da TB são: tosse, diminuição do peso  
15 corporal, febre baixa e dispnéia. Nos pacientes portadores de HIV, a TB  
16 progride mais rapidamente e apresenta frequentemente formas disseminadas,  
17 algumas vezes sem formação dos granulomas típicos (Metchock *et al.*, 1999).

### 18 19 **1.5. Diagnóstico**

20  
21 O diagnóstico da TB está baseado em análises microbiológicas, achados  
22 clínicos e exame radiológico de tórax. A análise microbiológica é a única capaz  
23 de estabelecer um diagnóstico definitivo, indicando a etiologia da infecção  
24 (Brodie & Schluger, 2005). O método microbiológico mais utilizado é a  
25 microscopia direta do escarro; demonstração do agente etiológico através do  
26 preparo de esfregaço em lâmina e coloração de Ziehl-Nielsen, que é um  
27 método barato, fácil e rápido de ser executado (Morone, 2005).

28  
29 Entretanto, a microscopia possui baixa sensibilidade, especialmente  
30 para detectar os casos paucibacilares (Brodie & Schluger, 2005). O rendimento  
31 da microscopia é de 50% a 80% dos casos de TB pulmonar, de acordo com a  
32 prevalência local e com os cuidados metodológicos empregados na  
33 manipulação das amostras respiratórias (Banfi *et al.*, 2003).

1 O cultivo, realizado a partir de diferentes amostras clínicas, apresenta  
2 maior sensibilidade em relação à microscopia, permitindo a detecção de um  
3 maior número de casos quando introduzido na rotina diagnóstica (Honscha *et*  
4 *al.* 2008; Silva *et al.*, 2009). Além disso, o isolamento do microrganismo  
5 possibilita a identificação da espécie, determinação do perfil de sensibilidade  
6 frente aos antimicrobianos e a realização de estudos de epidemiologia  
7 molecular (Ueki *et al.*, 2005).

8

9 Além dos exames complementares recomendados, outros testes de  
10 imagem, fenotípicos, imunossorológicos ou moleculares têm sido descritos na  
11 literatura. Embora a OMS recomende o uso do meio líquido para diagnóstico da  
12 TB, da TB resistente e testes moleculares para o diagnóstico de TB resistente,  
13 ela reconhece que a incorporação de inovações tecnológicas na rotina clínica  
14 depende de cada país e estimula a realização de estudos de custo-efetividade  
15 e de custo-benefício para avaliar o impacto no sistema de saúde em que será  
16 utilizado (WHO, 2008b)

17

18 Até o momento, nenhum teste imunossorológico está recomendado para  
19 diagnóstico de TB ativa ou TB latente em razão de seu baixo desempenho em  
20 países de elevada carga de TB e ao alto custo para a sua implantação. Do  
21 mesmo modo, ainda não está recomendado o uso de testes fenotípicos e  
22 moleculares *in house* para o diagnóstico de TB na prática clínica. Estes testes,  
23 desenvolvidos em laboratórios de pesquisa, apesar de apresentarem bons  
24 resultados de acurácia (sensibilidade e especificidade) nos locais em que foram  
25 desenvolvidos, não foram validados em outros cenários clínico epidemiológicos  
26 e laboratoriais, o que sugere que maiores estudos devam ser realizados  
27 (Steingert *et al.*, 2007; Steingert *et al.*, 2009).

28

## 29 **1.6. Tratamento**

30

31 A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso  
32 por tempo suficiente são os princípios básicos para o adequado tratamento,  
33 evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos

1 fármacos, assegurando assim a cura do paciente. A esses princípios soma-  
2 se o TDO como estratégia fundamental para o sucesso do mesmo (Brasil,  
3 2010).

4

5 O tratamento da TB é realizado como quatro drogas de primeira linha:  
6 INH, RMP, PZA e EMB (Zhang, 2005). A apresentação farmacológica deste  
7 esquema consiste em comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro  
8 medicamentos nas seguintes dosagens: RMP 150 mg, INH 75 mg, PZA 400  
9 mg e EMB 275 mg. Essa recomendação e apresentação farmacológica são  
10 as preconizadas pela Organização Mundial da Saúde e utilizadas na maioria  
11 dos países, para adultos e adolescentes. Para as crianças (abaixo de 10  
12 anos), permanece a recomendação do Esquema RHZ (RMP+INH+PZA)  
13 (Brasil,2010).

14

15 O esquema terapêutico para a eliminação do bacilo é constituído de  
16 duas fases. Na fase inicial, a doença é tratada em um regime intensivo de dois  
17 meses, que envolve a combinação de múltiplos antibióticos – RMP, INH, PZA e  
18 EMB. Na fase de continuação, RMP e INH são administradas por quatro a sete  
19 meses, para eliminar qualquer bacilo persistente (Cole & Alzari, 2005; Silva &  
20 Aínsa, 2007).

21

## 22 **1.7. Resistência**

23

24 O *M. tuberculosis* é naturalmente resistente a muitos antimicrobianos,  
25 devido principalmente, à parede celular altamente hidrofóbica, que atua como  
26 uma barreira para muitos compostos. Muitos determinantes potenciais de  
27 resistência são também codificados pelo genoma. Isso inclui enzimas  
28 hidrolíticas ou modificadoras de drogas como as  $\beta$ -lactamases e  
29 aminoglicosídeos transferases e bombas de efluxo. Este conjunto de  
30 características pode explicar a resistência natural ou inata a muitos  
31 quimioterápicos utilizados no tratamento das enfermidades infecciosas em  
32 geral (Rosseti *et al.*, 2002).

1 Os fatores que afetam negativamente os Programas Nacionais de  
2 Controle da Tuberculose (PNCT) incluem a falta de um esquema terapêutico  
3 padronizado, a deficiência na sua implementação e manutenção, escassez no  
4 fornecimento dos fármacos em áreas com recursos inadequados ou  
5 instabilidade política. O desenvolvimento da resistência também pode ser  
6 devido a uma escolha inapropriada do esquema terapêutico, ausência de  
7 esquemas terapêuticos padronizados e erros, como a prescrição de um único  
8 fármaco (Espinal, 2001).

9  
10 A não adesão do paciente ao tratamento prescrito é outro fator  
11 importante. O tratamento tem uma duração de seis meses, o que é  
12 considerado um período longo se comparado com o tratamento de outras  
13 infecções bacterianas, favorecendo assim o abandono (Zhang, 2005).

14  
15 O desenvolvimento da resistência pelos microrganismos é uma resposta  
16 evolucionária à pressão seletiva dos antibióticos, e acontece por seleção de  
17 mutantes resistentes na população bacteriana original, principalmente em  
18 ambientes com condições favoráveis de nutrição, oxigenação e pH, tal qual  
19 ocorre no interior da cavidade pulmonar (Barroso *et al.*, 2003). A resistência  
20 aos fármacos anti TB é classificada em: 1) resistência natural – que surge no  
21 processo de multiplicação do bacilo; sua importância se deve ao fato de limitar  
22 o número de fármacos disponíveis para tratamento e a favorecer o  
23 aparecimento de cepas com alto nível de resistência; 2) resistência primária -  
24 que se verifica em pacientes nunca tratados para TB, contaminados por bacilos  
25 previamente resistentes; 3) resistência adquirida ou secundária - que se verifica  
26 em pacientes, com TB inicialmente sensível, que se torna resistente após a  
27 exposição aos medicamentos (Mitchinson, 1998; Iseman, 1999).

28  
29 Para bactérias em geral, a resistência adquirida pode ser devido a  
30 mutações (mutações pontuais, deleções, inserções, inversões) ou por  
31 transferência genética horizontal. Em *M. tuberculosis* ainda não foi descrito  
32 nenhum elemento genético móvel, como os plasmídeos e transposons  
33 conferindo resistência (Zhang and Yew, 2009). Por isso, o desenvolvimento da

1 resistência neste microrganismo depende basicamente de alterações genéticas  
2 no genoma da bactéria, principalmente por mutações em genes alvo dos  
3 fármacos ou em genes que codificam ativadores dos pró-fármacos. As  
4 mutações se desenvolvem espontaneamente devido à taxa natural de mutação  
5 do DNA genômico, sendo selecionadas por sub-dosagem (Riska *et al.*, 2000;  
6 Normark e Normark, 2002; Silva e Palomino, 2011).

7

8 A resistência à INH é um processo complexo que envolve mutações em  
9 vários genes, incluindo *katG*, *ahpC*, *inhA*, *kasA* e *ndh* associadas a ele. A INH é  
10 um pró-fármaco ativado pela enzima catalase/peroxidase, que por sua vez, é  
11 codificada pelo *katG*. Uma vez ativada, a INH interfere na síntese do ácido  
12 micólico essencial através da inibição da enoil-ACP redutase  
13 dependente de NADH, que é codificada pelo *inhA*. Dois mecanismos  
14 moleculares têm sido apontados como a principal causa para a resistência à  
15 INH: mutações em *katG* e *inhA* ou, mais frequentemente, na sua região  
16 promotora (Zhang *et al.*, 1992; Rawat, *et al.*, 2003; Silva e Palomino, 2011).

17

18 O alvo da RMP no *M. tuberculosis* é a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase,  
19 onde se liga e inibe o alongamento do RNA mensageiro. Uma importante  
20 característica deste fármaco é que ele é ativo contra bacilos em multiplicação e  
21 de metabolismo lento. A grande maioria dos isolados clínicos de *M.*  
22 *tuberculosis* resistentes à RMP mostram mutações no gene *rpoB*, que codifica  
23 a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, resultando em alterações conformacionais  
24 que determinam uma baixa afinidade pelo composto e, conseqüentemente, o  
25 aparecimento de resistência (Mitchison, 1979; Telenti, *et al.*, 1993; Silva e  
26 Palomino, 2011).

27

28 No *M. tuberculosis*, ao contrário do observado em outras bactérias, a  
29 única topoisomerase presente é a topoisomerase II (DNA girase) e, portanto,  
30 este é o único alvo para as fluoroquinolonas. A topoisomerase II é um  
31 tetrâmero composto pela subunidade A e B, codificada pelos genes *gyrA* e  
32 *gyrB*, respectivamente, que catalisam o superenrolamento do DNA. Em  
33 estudos iniciais realizados em laboratório, cepas de *M. tuberculosis* e *M.*

1 *smegmatis* demonstraram que a resistência às fluoroquinolonas era resultado  
2 da substituição de aminoácidos na provável região de ligação destes em *gyrA*  
3 ou *gyrB* (Takiff, *et al.*, 1994; Silva e Palomino, 2011).

4

5 Embora pertençam a duas famílias distintas de antibióticos, a CAN, AMI,  
6 CAP e Viomicina (VIO) exercem sua atividade na tradução da proteína e há  
7 relatos de resistência cruzada entre elas desde 1975 (Tsukamura e Mizuno,  
8 1975). O mecanismo de resistência mais comum associado a estes fármacos é  
9 uma mutação A1401G no gene *rss* que codifica para o rRNA 16S, sendo mais  
10 frequente em cepas com alto nível de resistência à CAN e AMI (Jugheli *et al.*,  
11 2009; Silva e Palomino, 2011).

12

13 De acordo com o padrão de resistência do bacilo da TB identificado pelo  
14 teste de sensibilidade, classificamos as resistências em: 1) monorresistência:  
15 resistência a um fármaco antiTB; 2) polirresistência: resistência a dois ou mais  
16 fármacos anti TB, exceto à associação RMP e INH 3) multirresistência:  
17 resistência a pelo menos RMP e INH; 4) resistência extensiva: resistência a  
18 RMP e INH acrescida à resistência a uma fluoroquinolona e a um injetável de  
19 segunda linha (AMI, CAN ou CAP) (XDR – do inglês, *extensively drug resistant*  
20 – TB); 5) resistência a todos os medicamentos (TDR – do inglês, *totally drug-*  
21 *resistant*): cepas MDR que apresentam resistência a todas as drogas de  
22 segunda linha usualmente utilizados (aminoglicosídeos, polipeptídeos cíclicos,  
23 fluoroquinolonas, tioamidas, análogos da serina e derivados do ácido salicílico)  
24 (Iseman, 1999; Dalcolmo *et al.*, 2007, Velayati *et al.*, 2009).

25

26 A incidência crescente de MDR-TB tem sido verificada em todo o  
27 mundo, a partir da introdução da RMP aos esquemas terapêuticos, no final da  
28 década de 70. Tal fato é considerado, pela OMS e organizações parceiras, um  
29 dos grandes desafios para o controle da doença no mundo, pois se trata de  
30 resistência aos dois mais importantes medicamentos disponíveis para o  
31 tratamento da TB (Zignol *et al.*, 2005).

32

1           Dados referentes a 116 países mostram uma proporção de casos novos  
2 de TB com resistência de 17% a qualquer medicamento, 10,3% à INH, e  
3 multirresistência de 2,9%; e para casos com tratamentos prévios, resistência de  
4 35% a qualquer medicamento, 27,7% à INH, e multirresistência de 15,3%. A  
5 situação mais crítica está no leste europeu, um levantamento realizado em 49  
6 países que realizam teste de sensibilidade para medicamentos de segunda  
7 linha revelou um achado de 20% de casos com bacilos multirresistentes e 2%  
8 com bacilos extensivamente resistentes (WHO, 2004; WHO, 2006a; WHO,  
9 2008c).

10

11           Em 1996 foi realizado no Brasil o I Inquérito de Resistência aos  
12 medicamentos anti TB, que revelou proporções de 8,5% e 21% de resistência a  
13 qualquer medicamento para casos novos de TB e para casos com tratamento  
14 prévio, respectivamente. A resistência à INH para os casos novos de TB e para  
15 os casos com tratamento prévio foi de 4,4% e 11,3%, respectivamente. Para a  
16 multirresistência, as proporções para casos novos e com tratamento prévio  
17 foram de 1,1% e 7,9%, respectivamente. Os resultados do II Inquérito Nacional  
18 de Resistência revelam um aumento nas taxas de resistência primária à INH de  
19 4,4 para 6%. Apesar do Brasil encontrar-se, no cenário mundial, em situação  
20 confortável com relação as suas taxas de resistência e multirresistência, tendo  
21 notificado no ano de 2010 somente 607 de MDR-TB, esforços devem ser  
22 implementados no sentido de prevenir a emergência e propagação dessas  
23 cepas no país (Braga, *et al.*, 2003, WHO, 2011).

24

25           Entre 2000 e 2003, no Brasil, foram notificados 1.214 casos de TB  
26 multidroga-resistente, sendo que 45,4% ocorreram no Estado do Rio de  
27 Janeiro. Dentre estes pacientes, 95% apresentavam resistência adquirida. Em  
28 relação à co-infecção pelo HIV, do total de pacientes com TB multidroga-  
29 resistência e exame anti-HIV solicitado (988 pacientes), 8% eram positivos  
30 (Brito *et al.*, 2004)

31

32           A maioria dos casos de multirresistência no mundo é adquirida por  
33 tratamentos irregulares e abandono. No Brasil, 96% dos casos de resistência

1 notificados são adquiridos, sendo que mais da metade tem um histórico de três  
2 ou mais tratamentos prévios para TB, com lesões cavitárias bilaterais em 65%  
3 dos casos, e coinfeção pelo HIV de 7%. Para o tratamento desses casos, é  
4 necessário o uso de medicamentos injetáveis e de fármacos alternativos, com  
5 duração de 18 a 24 meses, cuja efetividade é de aproximadamente 60% (SVS,  
6 2007).

7

8 Além das graves consequências clínicas, terapêuticas e epidemiológicas  
9 de pacientes infectados com cepas MDR-TB, deve-se considerar também o  
10 impacto econômico, pois o tratamento para estes pacientes é cerca de 100  
11 vezes mais dispendioso do que o estimado para os pacientes com cepas  
12 sensíveis (Viedma, 2005). A detecção precoce da resistência aos fármacos anti  
13 TB é essencial para o correto controle da TB resistente (Coll, 2003) e permite a  
14 utilização de esquemas de tratamento adequado ao paciente, o que  
15 gera um impacto importante para o controle da doença (Martin, *et al.*, 2008).

16

### 17 **1.8. Determinação do perfil de sensibilidade**

18

19 O teste de sensibilidade das micobactérias frente aos antimicrobianos,  
20 tanto pode ser feito para fornecer informações úteis para a determinação do  
21 esquema terapêutico de um indivíduo, como para o planejamento das  
22 estratégias de tratamento em larga escala (Musa, *et al.*, 2005).

23

24 É importante realizar testes de sensibilidade aos antimicrobianos  
25 para medir a resistência às drogas, não só antes do tratamento, mas também  
26 durante o curso da terapia para identificar a resistência adquirida,  
27 especialmente em áreas com alta incidência de TB multidroga-resistente  
28 (MDR-TB) (Syre *et al.*, 2010).

29

30 A MDR-TB e XDR-TB constituem graves problemas para o controle  
31 eficiente da doença, demonstrando a necessidade de uma ferramenta de  
32 diagnóstico sensível, rápida e acessível (WHO 2006b).

33

1 A primeira tentativa para padronizar os testes de sensibilidade para o  
2 *M. tuberculosis* ocorreu em 1961, num encontro realizado na OMS, onde os  
3 métodos da Relação da Resistência, da Concentração Absoluta e das  
4 Proporções, todos qualitativos, foram propostos apenas para determinar se o  
5 microrganismo é suscetível ou resistente para os antibióticos, numa  
6 concentração fixa de droga. Apesar desta limitação, estes métodos ainda  
7 são utilizados em todo o mundo para monitorar a quimioterapia da TB  
8 (Palomino, *et al.*, 2005).

9  
10 O teste de sensibilidade às drogas mais utilizado para a identificação  
11 de bacilos resistentes tem sido o método das proporções (Martin *et al.*,  
12 2005). Além desse, o *resistance ratio method* e o método da concentração  
13 absoluta em meio sólido Löwestein-Jensen, o qual mede a porcentagem de  
14 clones resistentes em uma população e compara a relação de crescimento  
15 de organismos resistentes testados em três concentrações de uma droga  
16 com cepas selvagens suscetíveis, são também amplamente utilizados. Estes  
17 métodos, apesar do baixo custo, são laboriosos e levam de 3 a 6 semanas  
18 para a obtenção dos primeiros resultados (Collins *et al.*, 1997, Palomino *et*  
19 *al.*, 2005).

20  
21 Recentemente, diferentes metodologias têm sido propostas para  
22 avaliar a sensibilidade do *M. tuberculosis* frente aos antimicrobianos. Esses  
23 testes são classificados em dois tipos: genotípicos e fenotípicos (Palomino *et*  
24 *al.*, 2002).

### 25 26 1.8.1. Métodos genotípicos

27  
28 Avanços em biologia molecular tornaram possível investigar os  
29 mecanismos genéticos da resistência aos fármacos em *M. tuberculosis* e  
30 desenvolver métodos para rápida detecção de mutações associadas à  
31 resistência (Gardiner & Beavis, 2000). Atualmente, a maioria dos métodos  
32 disponíveis é para detecção de cepa resistente à RMP, porque, em *M.*

1 *tuberculosis*, a maioria das mutações está confinada a uma região pequena do  
2 gene (*rpoB*) que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase. Para a INH o  
3 mesmo não acontece, pois vários genes estão envolvidos com a resistência  
4 (Watterson & Drobniewski, 2003; Silva e Palomino, 2011).

5  
6 Diferentes técnicas moleculares servem para detecção de resistência em  
7 *M. tuberculosis*, tais como sequenciamento de DNA, Single Strand  
8 Conformation Polymorphism (PCR-SSCP), PCR-heteroduplex (Palomino *et al.*,  
9 2002). Os métodos de detecção da maioria das mutações, (mais de 95%) no  
10 gene *rpoB*, podem fornecer resultado, a partir da cultura primária ou  
11 diretamente do material clínico, entre 1 e 2 dias (Yue *et al.*, 2004).

12

### 13 1.8.1.1 Sequenciamento

14

15 O sequenciamento do DNA é uma metodologia baseada na reação em  
16 cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR), que analisa todos  
17 os nucleotídeos da região de DNA específica escolhida do genoma. Por esta  
18 análise e comparação da sequência do gene de uma cepa selvagem com a de  
19 uma cepa resistente é possível identificar mutações na cepa resistente que  
20 estão relacionadas com a resistência a determinado fármaco. Trata-se de uma  
21 metodologia eficaz, sensível e confiável que é considerada “padrão ouro”  
22 quando se trata de diagnóstico por técnicas de biologia molecular. Entretanto,  
23 apresenta alto custo operacional impedindo sua utilização na maioria dos  
24 países onde a TB é um problema de saúde pública (Shamputa *et al.*, 2004).

25

### 26 1.8.1.2 PCR-SSCP

27

28 O PCR-SSCP é um método que utiliza a análise de produto de  
29 amplificação da região de DNA de interesse do genoma da micobactéria num  
30 gel de poliacramida corado com nitrato de prata. O padrão de bandas que  
31 aparece neste gel permite a identificação de alterações nas regiões genômicas  
32 amplificadas, que levam a mudanças conformacionais e diferenças no  
33 comportamento durante a eletroforese. A identificação dos genes envolvidos

1 com a resistência é possível pela análise comparativa dos padrões observados  
2 na cepa selvagem e na cepa resistente. Esta metodologia é considerada  
3 rápida, durando apenas 24 horas, e é fácil de ser analisada, porém este  
4 método utiliza reagentes tóxicos e não fornece um resultado preciso e  
5 confiável, uma vez que a técnica apresenta problemas quanto a sensibilidade e  
6 especificidade Telenti *et al.*, 1993; Palomino *et al.*, 2002).

7

8 Com relação à sensibilidade, uma quantidade significativa de *M.*  
9 *tuberculosis* deve estar presente para estabelecer de forma inequívoca a  
10 presença de mutação no gene de resistência. Além disto, em caso de análise  
11 diretamente do escarro, se houver uma mistura de microrganismos sensíveis e  
12 resistentes na mesma amostra, a cepa minoritária deve representar mais de  
13 15% de todas as bactérias presentes na amostra para que seja possível  
14 identificar um padrão misto. Quanto à especificidade, os *primers* utilizados para  
15 o SSCP amplificam para a maioria das micobactérias, uma vez que o seu alvo  
16 é o *rpoB*, gene bem conservado entre as espécies, necessitando portanto de  
17 uma análise em paralelo para a determinação da espécie já que os padrões do  
18 SSCP são espécie específicos. Para a identificação de espécies, faz-se o PCR  
19 Restriction Analysis (PRA) que utiliza a proteína *hsp65* e diferencia a maioria  
20 das micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. Quando um  
21 novo padrão de SSCP é encontrado fica a dúvida se isto se deve ao fato de ser  
22 uma mutação nova ou uma mutação silenciosa. Neste caso é necessário que  
23 se faça o sequenciamento para comprovar onde ocorreu a mutação (Telenti *et*  
24 *al.*, 1993; Palomino *et al.*, 2002).

25

### 26 1.8.1.3 DNA-Microarrays

27

28 O DNA-Microarrays é um método que utiliza a análise de regiões  
29 mutadas através de um padrão estabelecido por um chip de DNA. O sistema é  
30 composto de uma matriz com várias sondas de DNA fixadas, que  
31 posteriormente serão hibridizadas e analisadas. A visualização do resultado se  
32 dá através de uma combinação de cores que indica o que está mutado e o que

1 tem padrão selvagem. Esta metodologia é rápida e eficiente, porém requer  
2 técnicos qualificados e tem alto custo (Kivi *et al.*, 2002).

3

#### 4 *1.8.1.4 Imno-LIPA Rif TB*

5

6 O Imno-LIPA Rif TB é um método para rápida detecção da resistência à  
7 RMP em *M. tuberculosis*. Está baseado no princípio de hibridização de fase  
8 sólida reversa e consiste na amplificação por PCR de um segmento do gene  
9 *rpoB*. A interpretação do padrão de bandas permite a identificação do complexo  
10 *M. tuberculosis* e a detecção das mutações no gene *rpoB*. O teste pode ser  
11 realizado em cultura de cepas e amostras clínicas, e seu tempo de realização é  
12 em torno de 48 horas (Shamputa *et al.*, 2004).

13

#### 14 *1.8.1.5 Xpert MTB/RIF*

15

16 O Xpert MTB/RIF é um teste automatizado, num formato de uma espécie  
17 de cartucho a partir da amplificação de ácidos nucleicos, utilizado para a  
18 detecção de *M. tuberculosis* e para a triagem de cepas resistentes a fármacos.  
19 O teste consiste na purificação, concentração e amplificação de ácidos  
20 nucleicos por PCR em tempo real e na identificação de sequências de ácidos  
21 nucleicos no genoma do *M. tuberculosis*, especificamente do gene *rpoB*. A  
22 diferença deste para os demais testes de amplificação de ácidos nucleicos  
23 utilizados na detecção de TB é que a plataforma do dispositivo de teste, o  
24 GeneXpert, integra e automatiza os três processos (preparação de amostras,  
25 amplificação e detecção), necessários para a PCR em tempo real baseada em  
26 testes moleculares (Brasil, 2011b).

27

28 Ele foi desenvolvido pela Cepheid,  
29 Inc. (Sunnyvale, EUA), em parceria com a Fundação para Novos Diagnósticos  
30 Inovadores (FIND) e as Universidade de Medicina e Odontologia de New  
31 Jersey (Newark, EUA) com o apoio do Instituto Nacional de Saúde dos Estados  
32 Unidos e a Fundação Bill & Melinda Gates. O Xpert MTB/RIF detecta o *M.*  
33 *tuberculosis*, assim como mutações que conferem resistência à RMP,

1 diretamente a partir do escarro, o que proporciona resultados dentro de 100  
2 minutos. Os resultados de estudos realizados a campo demonstram que um  
3 único teste pode detectar tuberculose em 99%  
4 de pacientes com TB pulmonar com baciloscopia positiva e em cerca de 70%  
5 dos pacientes com baciloscopia negativa. Os estudos também mostraram que  
6 enquanto a coinfeção HIV-TB diminui substancialmente a sensibilidade da  
7 microscopia, o mesmo não ocorre com o Xpert MTB/RIF. Além disso, Xpert  
8 MTB/RIF pode detectar resistência à RMP com sensibilidade de 95,1%  
9 e excluir a resistência com 98,4% de especificidade. Apesar de ser um teste  
10 promissor, ainda se encontra em fase de avaliação e apresenta uma série de  
11 limitações (Blakemore *et al.*, 2010).

12

13 Dentre as desvantagens do teste estão que um resultado positivo não  
14 indicar necessariamente a presença de organismos viáveis, tendo em vista que  
15 a PCR identifica material genético de microorganismos vivos ou mortos; a  
16 necessidade de uma fonte de energia elétrica estável e ininterrupta e um  
17 computador acoplado para a análise dos dados. O instrumento necessita de,  
18 pelo menos, uma calibração anual que, atualmente, precisa ser realizada por  
19 um técnico treinado, munido de um equipamento de calibração especializado.  
20 O dispositivo mais comumente utilizado, o GeneXpert (GX4), tem uma  
21 capacidade de análise limitada (4 amostras por vez) e sistemas maiores, com  
22 rendimentos de até 1000 testes/dia, acarretarão custos de capital mais  
23 elevados (Blakemore *et al.*, 2010; Evans, 2011; WHO, 2011).

24

#### 25 1.8.1.6 GenoType MTBDR

26

27 A GenoType MTBDR (Genotype MTBDR; Hain Life-science, Nehren,  
28 Germany), também conhecida como Fita Hain, é um tipo de sonda disponível  
29 comercialmente, que tem sido utilizada para detectar mutações nos genes  
30 *inhA*, *katG* e *rpoB* que conferem resistência à RMP e INH simultaneamente  
31 (Hillemann *et al.*, 2005; Makinen *et al.*, 2006).

32

1 Este método, introduzido em 2004, é utilizado direta e indiretamente e  
2 inclui três passos: extração de DNA, amplificação de multiplex PCR e  
3 hibridização reversa, gerando resultados entre 6 horas e 2 dias, tornando-o  
4 muito mais rápido que os DST tradicionais (Ling et al., 2008).

5  
6 Estudos realizados para avaliação do método demonstraram excelente  
7 acurácia para resistência à RIF, que é um indicador de MDR-TB, sugerindo que  
8 este seria uma boa ferramenta de triagem, especialmente em países com altas  
9 taxas de resistência e HIV. Enquanto a especificidade apresentou ser excelente  
10 para INH, a sensibilidade demonstrou ser modesta e extremamente variável,  
11 chegando a 90% com a última versão MTBDRplus. Ainda faltam estudos  
12 fazendo comparação de resultados entre pacientes com baciloscopia positiva e  
13 negativa, assim como casos pulmonares e extrapulmonares. Sua principal  
14 desvantagem remete ao custo e a infraestrutura necessária para sua utilização,  
15 o que acaba sendo um empecilho para seu emprego em países com recursos  
16 limitados (Ling *et al.*, 2008, Brasil, 2011b).

### 17 18 1.8.2. Métodos fenotípicos

19  
20 A resistência pode ser definida como a diminuição, *in vitro*, da  
21 sensibilidade do *M. tuberculosis*, em relação a cada fármaco, comparada com a  
22 cepa susceptível. A cada estudo mundial de resistência, há um esforço para  
23 que os laboratórios que realizam testes de sensibilidade façam parte de uma  
24 rede mundial, o que asseguraria a qualidade dos resultados (Lazlo, 1997;  
25 Heifts *et al.*, 2000).

26  
27 Os métodos fenotípicos convencionais, que utilizam meios sólidos, para  
28 testar sensibilidade dos fármacos são: método da concentração absoluta ou  
29 método da concentração mínima inibitória, método da razão de resistência e  
30 método das proporções e suas variantes são os recomendados pela OMS. Os  
31 métodos com meios de cultura a base de Ágar Middlebrook 7H10 e 7H11,  
32 também são utilizados para determinar sensibilidade aos antimicrobianos.  
33 (Palomino *et al.*, 2002).

1 A partir de 1980, o desenvolvimento dos sistemas comerciais  
2 automatizados ou semi-automatizados, radiométricos ou colorimétricos para a  
3 detecção do crescimento de micobactérias, em tempo menor (14 dias) que o  
4 exigido para os convencionais (30 dias) trouxe maior agilidade aos resultados  
5 (Martin *et al.*, 2005; Musa *et al.*, 2005; Sanchotene *et al.*, 2008)

6  
7 Embora os métodos das proporções e o sistema BACTEC 460® sejam  
8 considerados como referências, existem outros métodos comerciais disponíveis  
9 como os sistemas MB/BacT® (Biomérieux), BACTEC 9000® (Becton  
10 Dickinson), AccuMed ESP® (ESP) e o MGIT® (*Mycobacteria Growth Indicator*  
11 *Tube-MGIT*, Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) que são  
12 colorimétricos e têm sido preferidos aos radiométricos que produzem resíduos  
13 radioativos. Esses testes comerciais permitem a obtenção de resultado em  
14 torno de 10 dias, mas requerem insumos e equipamentos caros, o que dificulta  
15 sua incorporação em países em desenvolvimento. Estudos de custo-efetividade  
16 sobre o uso do sistema automatizado MGIT960 no diagnóstico de TB no SUS  
17 estão em fase final de avaliação (Mengatto *et al.*, 2006; Brasil, 2010).

18  
19 Embora o uso de testes fenotípicos e moleculares *in house* para o  
20 diagnóstico de TB na prática clínica ainda não seja amplamente difundido, nos  
21 últimos anos optou-se pela busca de novos métodos que aumentassem a  
22 acurácia na determinação do perfil de sensibilidade. Estes testes,  
23 desenvolvidos em laboratórios de pesquisa, apesar de apresentam bons  
24 resultados de acurácia (sensibilidade e especificidade) nos locais em que foram  
25 desenvolvidos, devem ser validados em outros cenários clínico-  
26 epidemiológicos e laboratoriais, além de apresentarem alta reprodutibilidade  
27 (WHO,2011).

#### 28 29 1.8.2.1 Método das Proporções

30  
31 Este método foi padronizado por Canetti, Rist e Grosset em 1963, e  
32 consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes presentes em uma  
33 amostra de *M. tuberculosis* frente a uma concentração do fármaco que é capaz

1 de inibir o desenvolvimento das células susceptíveis, mas não as células  
2 resistentes, na concentração crítica (Barroso *et al.*, 2004).

3

4 Para cada droga foi definida uma proporção de mutantes resistentes em  
5 uma população bacilar, igual ou acima da qual a amostra é considerada  
6 resistente (proporção crítica), indicando uma possível falência terapêutica. As  
7 concentrações críticas de RMP e INH são, respectivamente, 0,2 µg/ml e 40,0  
8 µg/ml, enquanto a proporção crítica é de 1,0 % para ambas as drogas (Canetti  
9 *et al.*, 1963; Barroso *et al.*, 2004).

10

11 A cultura é feita no meio sólido LJ a base de ovo, asparagina e glicerol,  
12 sendo as drogas incorporadas antes da etapa da coagulação (Canetti *et al.*,  
13 1963). No Brasil esta é a metodologia recomendada pelo Ministério da Saúde  
14 para ser utilizada nos laboratórios de Bacteriologia da TB. Esta metodologia é  
15 sensível, de baixo custo, porém fornece resultados quantitativos depois de 60  
16 dias do cultivo primário (Rosseti *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2005).

17

#### 18 1.8.2.2 BACTEC TB 460®

19

20 Este método foi disponibilizado no mercado na década de 80 pela  
21 empresa Becton and Dickinson Instruments System. O aparelho detecta CO<sub>2</sub>  
22 radioativo liberado pela utilização de C<sup>14</sup> do ácido palmítico, presente no meio  
23 de cultura líquido a base de ágar (7H12A e 7H12B), consumido pela  
24 micobactéria. Esta metodologia é sensível e fornece resultados em até 14 dias,  
25 porém utiliza material radioativo, além de apresentar alto custo. Estudos  
26 demonstraram que sua concordância é de 95 a 97% com o método das  
27 proporções (Kumar *et al.*, 2005).

28

#### 29 1.8.2.3 BACTEC MGIT 960®

30

31 Este método não utiliza material radioativo, pois o meio de cultura, a  
32 base de ágar (7H12A e 7H12B), é constituído de um composto fluorescente,  
33 embebido em silicone, que é sensível à presença do oxigênio dissolvido no

1 meio. Inicialmente, uma grande quantidade do oxigênio dissolvido extingue as  
2 emissões do composto e pouca fluorescência pode ser detectada.  
3 Posteriormente, microrganismos respirando ativamente no meio, consomem o  
4 oxigênio o que ocasiona a emissão da fluorescência e sua detecção pelo  
5 equipamento (Rivera *et al.*, 1997).

6

7 As leituras da fluorescência são realizadas de maneira contínua e  
8 simultânea e um ciclo de leitura é completado a cada ciclo 60 minutos. Uma  
9 série de Diodos Emissores de Luz (LEDs), localizados abaixo dos tubos se  
10 iluminam, ativando os sensores fluorescentes dos mesmos. Os detectores de  
11 luz realizam, então, a leitura. As culturas positivas são imediatamente indicadas  
12 através de sinais luminosos e alarmes sonoros. Este sistema de detecção  
13 possibilita a emissão de resultados de detecção e testes de sensibilidade em  
14 tempo bem menor do que os métodos convencionais (Rivera *et al.*, 1997).

15

16 No final da década de 90, passou a ser considerado padrão ouro, pois  
17 além de demonstrar performance similar ao método de proporções, apresentou  
18 tempo médio de detecção de 7 dias. Estudos demonstram que há elevada  
19 concordância entre a *performance* do MGIT 960® e os três métodos até então  
20 considerados de referência para o diagnóstico de TB resistente: a) Método de  
21 Proporções, b) Bactec 460®, e c) Razão da resistência. O MGIT 960® está  
22 validado e aprovado pela ANVISA para os seguintes fármacos: STR, INH, RMP  
23 e EMB. A metodologia é sensível, porém de alto custo quando comparada com  
24 o tradicional MP (Rüsch-Gerdes *et al.*, 2006; Brasil, 2010).

25

26 *1.8.2.4 MODS (Microscopic Observation Broth Drug Susceptibility Assay)*

27

28 É um método não automatizado em meio líquido a base de ágar (7H9),  
29 que depois de 8 dias podem ser observadas no microscópio invertido com filtro  
30 para campo escuro para visualizar o fator corda formado pela micobactéria  
31 (Park *et al.*, 2002). Os estudos até o momento sugerem que a técnica MODS  
32 tem sensibilidade e especificidade similares aos métodos de cultura  
33 tradicionais. Apesar de reduzir o tempo de obtenção do resultado, requer

1 técnicos de laboratório com elevado grau de proficiência e de biossegurança  
2 em razão do uso de meio líquido em placas de Petri (Brasil, 2010).

#### 3 4 1.8.2.5 *D29-Phage Assay*

5  
6 É um método manual realizado em meio líquido (7H9), baseado na  
7 capacidade do micobacteriófago de infectar as células, lisando sua parede  
8 celular, quando a micobactéria é resistente aos fármacos (Gali *et al.*, 2003;  
9 Silva *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado que esse método apresenta uma  
10 especificidade e sensibilidade em torno de 100% para detectar resistência em  
11 INH e RMP quando comparado com o método das proporções, Alamar Blue,  
12 Resazurin Microtiter Assay (REMA) e brometo de tetrazólio (MTT) (Silva *et al.*,  
13 2006).

#### 14 15 1.8.2.6 *Método da detecção de microcolônias – Thin Layer*

16  
17 É um método que utiliza meio sólido a base de ágar (7H11) em placas  
18 de Petri, onde é inoculada a cultura de micobactérias. Depois de 10 dias, as  
19 microcolônias são observadas no microscópio comum. Este método é rápido e  
20 fácil de ser realizado (Mejia *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2007).

#### 21 22 1.8.2.7 *E-Test-Epsilon*

23  
24 É um método quantitativo da concentração mínima inibitória (CMI) das  
25 drogas. Metodologia manual, que utiliza meio sólido a base de ágar (7H11) e  
26 fitas impregnadas com um gradiente de concentração de droga. Depois de 5 a  
27 7 dias, a leitura é feita através da elipse formada no meio de cultura. Este  
28 método é fácil, mas as fitas são de alto custo. O teste vem se mostrando  
29 reprodutível e de fácil execução (Freixo, *et al.*, 2002). Um estudo demonstrou  
30 que a correlação entre o E-Test-Epsilon e o método das proporções foi 84,4%  
31 para INH, 90,8% para RMP, 85,7% SMR e 77,3% para EMB (Birinci *et al.*,  
32 2002).

33

#### 1 1.8.2.8 Alamar Blue Assay

2  
3 É um revelador oxi-redução que, geralmente, indica crescimento celular  
4 e/ou viabilidade. A parcela de oxidação do revelador não é fluorescente e  
5 apresenta coloração azul, enquanto que a etapa de redução é fluorescente e  
6 de coloração rosa. O crescimento pode ser medido com fluorometria,  
7 espectrofotometria ou com determinação visual da coloração (Palomino *et al.*,  
8 2004).

9  
10 O Alamar Blue foi utilizado para determinação da CMI de isolados de *M.*  
11 *tuberculosis*, frente aos fármacos INH, RMP, SMR e EMB. A concordância com  
12 o método das proporções em ágar foi de 97% para todos os fármacos e o  
13 tempo e resultado foi de 7 dias para 58%, 10 dias para 28% e 14 dias para  
14 14% dos 50 isolados testados (Palomino *et al.*, 2004).

#### 15 16 1.8.2.9 Brometo de Tetrazólio (MTT)

17  
18 O sal mais utilizado é o MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-  
19 tetrazolium bromide), que é reduzido por células viáveis, produzindo cristais  
20 insolúveis de formazana, com mudança de coloração, que depois da  
21 solubilização podem ser medidos pelo espectrofotômetro (Mshana *et al.*, 1998;  
22 Palomino *et al.*, 2004).

23  
24 O tetrazólio foi utilizado para determinação da CMI de 279 isolados  
25 clínicos de *M. tuberculosis*, frente aos fármacos INH e RMP. A comparação  
26 com o método das proporções em ágar mostrou uma especificidade e  
27 sensibilidade de 100% e 94,1% para RMP e 99,5 % e 89,2% para INH,  
28 respectivamente (Foongladda *et al.*, 2002; Palomino *et al.*, 2004).

#### 29 30 1.8.2.10 Resazurina

31  
32 A resazurina é uma substância heterocíclica N-óxido (7-Hydroxy-3H-  
33 phenozazin-3-one-10 oxide) que foi descoberta em 1871 por Weselky e durante

1 muitas décadas foi utilizada para demonstrar a desidrogenação de vários  
2 compostos (Palomino *et al.*, 2004).

3

4 O Resazurin Microtitre Assay (REMA) foi utilizado para determinação da  
5 CMI de isolados clínicos de *M. tuberculosis*, frente aos fármacos INH e RMP.  
6 Comparando-se com o método das proporções, o REMA apresentou  
7 especificidade e sensibilidade de 100% para RMP e 96,2% e 100% para INH,  
8 respectivamente (Palomino *et al.*, 2004).

9

10 O REMA foi testado com sucesso para detecção de cepas MDR-TB em  
11 isolados clínicos, com os antibióticos STR, INH e RMP, tendo resultados  
12 obtidos em 7 dias (Montoro *et al.*, 2005, Spies *et al.*, 2011). Em 2005,  
13 começou-se a aplicar este método para isolados clínicos de *M. tuberculosis*  
14 com drogas de segunda linha, obtendo-se bons resultados (Martin *et al.*, 2003;  
15 Montoro *et al.*, 2005, Sanchotene *et al.*, 2008). Este método também tem sido  
16 utilizado amplamente para o teste de novos fármacos para o controle da TB  
17 (Ramos *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2010; D'oca *et al.*, 2010).

18

#### 19 1.8.2.11 Nitrate Reductase Assay (NRA)

20

21 A proposta desse método foi originada no Instituto Central de Pesquisa  
22 em TB de Moscou – Rússia, onde foi chamado de método de Griess, depois  
23 que J. P. Griess descobriu a detecção química utilizada no método (Ängeby *et*  
24 *al.*, 2002).

25

26 O método é baseado na habilidade do *M. tuberculosis* em reduzir o  
27 nitrato a nitrito, que é rotineiramente utilizado para identificação bioquímica das  
28 espécies micobacterianas. A presença do nitrito é facilmente detectada por  
29 reagentes específicos, que produz a alteração da coloração, tanto em meios  
30 sólidos quanto líquidos (Montoro *et al.*, 2005; Mengatto *et al.*, 2006,  
31 Sanchotene *et al.*, 2008).

32

1           O NRA, juntamente com o REMA, foram selecionados para possível  
2 recomendação pela OMS para diagnóstico de resistência em teste de  
3 sensibilidade em *M. tuberculosis* (Brasil, 2010).

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1  
2  
3 1. ÄNGEBY, K.A.; KLINTZ, L.; HOFFNER, S.E. Rapid and inexpensive drug  
4 susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase  
5 assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n.2, p.553-555.  
6 2002.

7  
8 2. BANFI, E; SCIALINO, G.; MONTI-BRAGADIN, C. Development of a  
9 microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug  
10 susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford v. 52, p. 796–  
11 800, 2003.

12  
13 3. BARRETO, M.L.; PEREIRA, S.M. FERREIRA. A.A. BCG vaccine: efficacy  
14 and indications for vaccination and revaccination. **Jornal de Pediatria**, Rio de  
15 Janeiro, v.82, n.3, p.45-54. 2006.

16  
17 4. BARROSO, E.C.; MOTA, R.M.S.; SANTOS, R.O.; SOUSA, A.L.O;  
18 BARROSO, J.B.; RODRIGUES, J.L.N. Risk factors for acquired multi-  
19 drugresistant tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Ribeirão Preto,  
20 v.29, n.2, p.89-97.2003.

21  
22 5. BARROSO, E.C.; MOTA, R.M.S.; PINHEIRO, V.G.F.; CAMPELO, C.L.  
23 Ocorrência de tuberculose doença entre contatos de tuberculose sensível e  
24 multirresistente. **J. Bras. Pneumol.**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 401- 408, 2004.

25  
26 6. BECERRA, M.C.; BAYTONA, J.; FREEMAN, J.; FARMER, P.E.; KIM, J.Y.  
27 Redefining MDR-TB transmission “hot spot”. **The International Journal of**  
28 **Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v.4, n.5, p.387-394. 2000

29  
30 7. BECK, R.W. **A chronology of microbiology**. Washington: ASM Press,  
31 2000. 400 p.

32

- 1 8. BIRINCI, A.; COBAN, A.Y.; EKINCI, B. DURUPINAR, B. Comparison of the  
2 Proportion Method with Mycobacterial Growth Indicator Tube and E-teste for  
3 Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Memórias do Instituto**  
4 **Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.36, p.351-352.2002.
- 5
- 6 9. [BLAKEMORE, R.; STORY, E.; HELB, D.; KOP, J.; BANADA, P.; et al.](#)  
7 [Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. \*\*J Clin\*\*](#)  
8 [Microbiol](#), Washington, v. 48, n.7, p. 2495–2501. 2010
- 9
- 10 10. BRAGA, J.U.; WERNECK BARRETO, A.; HIJJAR M. A. Inquérito  
11 epidemiológico de resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose  
12 no Brasil. **Bol Pneumol Sanit** , Rio de Janeiro, v. 11, n.1, p.76-81. 2003.
- 13
- 14 11. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema  
15 de Informação de Agravos de Notificação. **Tuberculose - Casos confirmados**  
16 **notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2011a.**  
17 Sinan Net. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acessado  
18 em: Fev/2012.
- 19
- 20 12. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária..  
21 Xpert MTB/TIF no diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Boletim Brasileiro de**  
22 **Avaliação de Tecnologias em Saúde**, Brasília, n.16. Set 2011b.
- 23
- 24 13. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.  
25 Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Manual de Recomendações**  
26 **para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde;  
27 2010. Disponível em:  
28 [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_de\\_recomendacoes\\_contr](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_contr)  
29 [ole\\_tb\\_novo.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_contr). Acessado em Dez/2011.
- 30
- 31 14. BRITO, R.C; GOUNDER, C.; DE LIMA, D.B.; SIQUEIRA, H.; CAVALCANTI,  
32 H.R.; PEREIRA M.M. Resistência aos medicamentos anti-tuberculose de cepas  
33 de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital

- 1 geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. **J Bras**  
2 **Pneumol**, São Paulo, v. 30, n.4, p. 335-342. 2004.  
3
- 4 15. BRODIE, D.; SCHLUGER, N.W. The diagnosis of tuberculosis. **Clinics in**  
5 **Chest Medicine**, Philadelphia, v. 26, p. 247-271. 2005.  
6
- 7 16. CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J.; HAUDUROY, P.;  
8 LANGEROVA, M.; MAHLER, H.; et al. Mycobacteria: Laboratory Methods for  
9 Testing Drug Sensitivity and Resistance. **Bulletin of the World Health**  
10 **Organization**, Geneva, v.29, p.565-578. 1963.  
11
- 12 17. CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - National  
13 Center for HIV, STD, and TB Prevention - Division of Tuberculosis Elimination -  
14 Atlanta, Georgia - Inside: Continuing Medical Education for U.S. Physicians and  
15 Nurses. **Core Curriculum on Tuberculosis – What the clinician should**  
16 **know** – 4° edition, 2000.  
17
- 18 18. COELHO, T. S.; SILVA, R. S. F.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; SCAINI,  
19 C. J.; MOURA, K. C. G.; SILVA, P. E. A. Activity of  $\beta$ -lapachone derivatives  
20 against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium*  
21 *tuberculosis*. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 90, n.5, p. 293-297. 2010.  
22
- 23 19. COLE, S.T.; BROSCH, R. PARKHILL, J. GARNIER, T. CHURCHER, C.  
24 HARRIS, D. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the  
25 complete genome sequence. **Nature**, New York, v.393, n.6685, p.537-  
26 544.1998.  
27
- 28 20. COLE, S.T. & ALZARI, P.M. TB - a new target, a new drug. **Science**,  
29 Washington, v. 307, n. 5707, p. 214-215. 2005  
30
- 31 21. COLE, S.T., EISENACH, K.D., MCMURRAY, D.N., JACOBS, W.R.  
32 **Tuberculosis and the tubercle bacillus**. Washington: ASM Press. 2005. 584  
33 p.

- 1 22. COLL, P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*.  
2 **Enferm Infecc Microbiol Clin.** , Valencia, v. 21, n. 6, p. 299-308. 2003.
- 3
- 4 23. COLLINS, L.A., FRANZBLAU, S.G. Microplate Alamar Blue Assay versus  
5 BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against  
6 *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob. Agents**  
7 **Chemother.**, Washington, v. 41, p.1004-1009. 1997.
- 8
- 9 24. COSIVI, O.; GRANGE, J.M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M.C.;  
10 FUJIKURA, T.; COUSINS, D.;ROBINSON, R.A.F.; HUCHZERMEVER, H.;  
11 KANTOR, I.; MESLIN, F. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in  
12 Developing Countries. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 4, n. 1, p. 59-70, 1998.
- 13
- 14 25. DALCOLMO M.P.; ANDRADE M.K.N.; PICON P.D. Tuberculose  
15 Multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Rev Saúde Pública**,  
16 São Paulo, v. 41, supl.1, p.43-42. 2007.
- 17
- 18 26. DANIEL, T.M. The history of tuberculosis. **Respir Med**, Davos, v. 100, n.  
19 11, p. 1862-1870. 2006.
- 20
- 21 27. DE ROSSI, E.; AÍNSA, J.A. RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux  
22 transporters in drug resistance: na unresolved question. **FEMS microbiology**  
23 **reviews**, Amsterdam, v.30, n.1.p.36-52.2006.
- 24
- 25 28. DOCA, C. R. M.; COELHO, T.; MARINHO, T. G.; HACK, C. R. L.; DUARTE,  
26 R. C.; SILVA, P. E. A.; DOCA, M. G. M. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**  
27 **Letters**, Maryland, v. 20, p. 5255-5257, 2010.
- 28
- 29 29. ESPINAL, M.A.; LASERSON, K.; CAMACHO, M.; FUSCHENG, Z.; KIM,  
30 S.J.; TLALI, E.; SMITH, I.; SUAREZ, P.; ANTUNES, M.L.; GEORGE, A.G. *et al.*  
31 Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries. **Int J**  
32 **Tuberc Lung Dis.**, Paris, v. 5, n. 10, p. 887-893. 2001.

- 1 30. EVANS, C.A. GeneXpert—A Game-Changer for Tuberculosis Control?  
2 **Plos Medicine**, Cambridge, v.8, n.7, 2011 Disponível em:  
3 [http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1](http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1001064)  
4 [001064](http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1001064). Acessado em 04 abr. 2012.  
5
- 6 31. FOONGLADDA S, ROENGSANTHIA D, ARJRATTANAKOOL W,  
7 CHUCHOTTAWORN C, CHAIPRASERT A, FRANZBLAU SG. Rapid and  
8 simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of  
9 *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis.**, Paris, v. 6, p.1118-1122.  
10 2002.  
11
- 12 32. FREIXO, M.I.M.; CALDAS, P.C.S.; MARTINS, F.; BRITO, R.C.; FERREIRA,  
13 RMC.; FONSECA, L.S. Evaluation of E-test strips for rapid susceptibility testing  
14 of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington,  
15 v.40, n.6, p.2282-2284.2002.  
16
- 17 33. GALÍ, N.; DOMINGUEZ, J.; BLANCO, S.; PRAT, C.; QUESADA, M.D.;  
18 MATAS, L. Utility of an in house mycobacteriophage-based assay for rapid  
19 detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical  
20 isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.6, p.2647-  
21 2649.2003.  
22
- 23 34. GARDINER, D.F.; BEAVIS, K.G. Laboratory diagnosis os mycobacterial  
24 infections. **Seminars in respiratory infections**, Orlando, n.15, v.7, p.132-  
25 143.2000.  
26
- 27 35. GILLESPIE, H.S. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium*  
28 *tuberculosis*: clinical and molecular perspective. **Antimicrob Agents**  
29 **Chemother.**, Washington, v. 46, n. 2, p. 267-274. 2002.  
30
- 31 36. GOMEZ I PRAT, J.; SOUZA, S.M.F.M. Prehistoric Tuberculosis in América:  
32 Ading Coments to a Literature Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de  
33 Janeiro, v. 98, n. 1, p. 151-159. 2003.

- 1 37. HEIFITS, L.; LINDER, T.; SANCHEZ, T.; SPENCER, D.; BRENNAN, J. Two  
2 liquid medium systems, Mycobacterium Growth Indicator Tube and MB Redox  
3 Tube, for *Mycobacterium tuberculosis* isolation from sputum specimes. **Journal**  
4 **of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.3, p.1227-1230.2000.  
5
- 6 38. HILLEMANN, D.; WEIZENEGGER, M.; KUBICA, T.; RICHTER, E.;  
7 NIEMANN, S. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin  
8 and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates.  
9 **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, p.3699-3703, 2005.  
10
- 11 39. ISEMAN, M. D. Treatment and implications of multidrug-resistant  
12 tuberculosis for the 21<sup>st</sup> century. **Chemotherapy**, Basel, v. 45, p.34-40. 1999.  
13
- 14 40. JUGHELI, L.; BZEKALAVA, N.; DE RIJK, P.; et al. High level of cross-  
15 resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among  
16 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with  
17 mutations in the rrs gene. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 53,  
18 p.5064-5068, 2009.  
19
- 20 41. KIVI, M.L.; XUEMIN,S.; RAYCHAUDHURI, R.; ALTMAN, B. SMALL, P.M.  
21 Determining the genomic locations os repetitive DNA sequence with a whole-  
22 genome microarray IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical**  
23 **Microbiology**, Washington, v.40, n.6, p.2192-2198.2002.  
24
- 25 42. KOCH R. Die Aetiologie der Tuberkulose. **Berliner Klinische**  
26 **Wochenschrift**, Berlim, v.19, n.15, p.221-230. 1882.  
27
- 28 43. KUMAR, M.; KAN, I.A.; VERMA, V. KALYAN, N.; QAZI, G.N. Rapid,  
29 inexpensive MIC determination of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using  
30 microplate nitrate reductatse assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious**  
31 **Disease**. New York, v.53, n.2, p.121-124.2005.  
32

- 1 44. LAZLO, A.; RAHMAN, M.; RAVIGLIONE, M.C. BUSTREO, F. Quality  
2 assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium*  
3 *tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Laboratory Network: first round  
4 of proficiency testing. **The International Journal Tuberculosis and Lung**  
5 **Disease**, Paris, v.3, p.231-238. 1997.  
6
- 7 45. LING, D.I.; ZWERLING, A. A.; PAI, M. GenoType MTBDR assays for the  
8 diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. **European**  
9 **Respiratory Journal**, Paris, v. 32, p. 1165-1174, 2008.  
10
- 11 46. MAKINEN, J.; MARTTILA, H. J.; MARJAMAKI, M.; VILJANEN, M. K.,  
12 SOINI, H. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for  
13 detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**,  
14 Washington, v.44, p.350-352, 2006.  
15
- 16 47. MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Resazurin  
17 microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to  
18 second-line drugs: rapid, simples, and inexpensive method. **Antimicrobial**  
19 **Agents and Chemotherapy**, Washington, v.47, n.11, p.3616-3619.2003.  
20
- 21 48. MARTIN, A. MORCILLO, N.; LEMUS, D.; MONTORO, E.; SILVA TELLES,  
22 M.A.; SIMBOLI, N. Multicenter study os MTT and resazurin assays for testing  
23 susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. **The International Journal of**  
24 **Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v.9, n.8, p.901-906. 2005.  
25
- 26 49. MARTIN A, PORTAELS F, PALOMINO JC. Colorimetric redox-indicator  
27 methods for the rapid detection. of multidrug resistance in *Mycobacterium*  
28 *tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. **J Antimicrob**  
29 **Chemother**, Oxford, v. 62, n.1, p.56-64. 2008.  
30
- 31 50. MEJIA, G.I.; CASTRILLON, L.; TRUJILLO, H.; ROBLEDO, J.A. Microcolony  
32 detection in 7H11 thin layer culture isan alternative for rapid diagnosis of

- 1 *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The International Journal Tuberculosis**  
2 **and Lung Disease**, Paris, v.3, n.2, p.138-142. 1999.
- 3
- 4 51. MENGATTO, L.; CHIANI, Y.; IMAZ, M.S. Evaluation of rapid alternative  
5 methods for drug susceptibility testing in clinical isolates of *Mycobacterium*  
6 *tuberculosis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.10, n.5,  
7 p.535-542.2006.
- 8
- 9 52. METCHOCK, B.G.; NOLTE, F.S.; WALLACE, R. J. *Mycobacterium*.  
10 In:\_\_\_\_\_ **Manual of clinical microbiology**, Washington: ASM Press, 1999.  
11 p.399-437.
- 12
- 13 53. MIGLIORI, G.B.; DE IACO, G.; BESOZZI, G., CENTIS, R.; CIRILLO, D.M.  
14 First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. **Euro Surveillance**,  
15 v.12, n.20, pii 3194. 2007.
- 16
- 17 54. MITCHINSON, D. A. How drug resistance emerges as a result of poor  
18 compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. **Int J Tuberc**  
19 **Lung Dis**, Paris, v.2, p.10-15. 1998.
- 20
- 21 55. MITCHISON, D.A. Basic mechanisms of chemotherapy. **Chest**, Northbrook,  
22 v,76, supl. 771, p. 771-781, 1979.
- 23
- 24 56. MONTORO, E.; LEMUS, D.; ECHEMENDIA, M.; MARTIN, A.; PORTAELS,  
25 F.; PALOMINO, J.C. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the  
26 MTT test and the resazurin microtiter assay for drug susceptibility testing of  
27 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Antimicrob. Chemother.**,  
28 Oxford, v. 55, n.4, p. 500-505. 2005.
- 29
- 30 57. MORONE, N. Diagnóstico da tuberculose em sintomáticos respiratórios.  
31 Comentários a respeito da II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia  
32 e Tisiologia e Ministério da Saúde. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**,  
33 Ribeirão Preto, v.31, n.4, p. 350-355. 2005.

- 1 58. MSHANA, R.N.; TADESSE, G.; ABATE, G.; MIÖNER, H. Use of 3-(4,5-  
2 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromide for rapid detection of  
3 Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical**  
4 **Microbiology**, Washington, v.36, n.5, p.1214-1219.1998.  
5
- 6 59. MUSA, H.R.; AMBROGGI, M.; SOUTO, A.; ÄNGEBY, K.A. Drug  
7 Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a Nitrate Reductase  
8 Assay Applied Directly on Microscopy-Positive Sputum Samples. **Journal of**  
9 **Clinical Microbiology**. Washington, v.43, n.7, p.3159-3161. 2005.  
10
- 11 60. NATAL, S. Emergência da resistência às drogas. **Bol. Pneumol. Sanit.**,  
12 Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, dez. 2002 . Disponível em  
13 <[http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-460X2002000200009&lng=pt&nrm=iso)  
14 [460X2002000200009&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-460X2002000200009&lng=pt&nrm=iso)>. Acessado em 10 jan. 2012.  
15
- 16 61. NIERO, C.V.; LEÃO, S.C.. **Limitações do uso do fragmento mtp40 como**  
17 **marcador de diferenciação entre *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis*.**  
18 Disponível em:  
19 [http://www.jornaldepneumologia.com.br/portugues/artigo\\_detalhes.asp?id=46](http://www.jornaldepneumologia.com.br/portugues/artigo_detalhes.asp?id=46)  
20 Acesso em: 03 fev. 2012.  
21
- 22 62. NORMARK, B.H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic  
23 resistance. **J Intern Med**, Stockholm, v. 252, p. 91–106. 2002.  
24
- 25 63. ONYEBUJOH, P. & ROOK, G.A.W. Tuberculosis. **Nature reviews /**  
26 **microbiology**, Londres, v. 2, p. 930-932. 2004.  
27
- 28 64. PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; PORTAELS, F. New methods for the  
29 diagnosis and drug resistance detection in mycobacteria. **Recent Res Devel**  
30 **Microbiology**, Antwerp, v.6, p.297-318. 2002.  
31

- 1 65. PALOMINO, J.C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of  
2 tuberculosis: feasibility and applicability in the field. **The European Respiratory**  
3 **Journal**, Copenhagen, v.26, n.2,p.1-12.2004.  
4
- 5 66. PALOMINO, J.C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of  
6 tuberculosis: feasibility and applicability in the field. **The European Respiratory**  
7 **Journal**, Copenhagen, v.26, n.2, p.1-12. 2005.  
8
- 9 67. PARK, Y.Z.; KIM, B.J.; RYU, S.; KOOK, Y.H.; CHOE, Y.K.; BAI, G.H.; *et al.*  
10 Cross-resistance between rifampicin and KRM-1648 is associated with specific  
11 *rpoB* alleles in *Mycobacterium tuberculosis*. **The International Journal**  
12 **Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v.6, n.2, p. 166-170. 2002.  
13
- 14 68. RAMOS, D. F.; LEITÃO, G. G.; COSTA, F. N.; ABREU, L.; VILLARREAL, J.  
15 V.; LEITÃO, S. G.; FERNANDEZ, S. L. S.; SILVA, P. E. A. Investigation of the  
16 antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest.  
17 Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 44, n.4, p.669-674.  
18 2008.  
19
- 20 69. RAVIGLIONE, M.C. The TB epidemic from 1992 to 2002. **Tuberculosis**,  
21 Edimburg, v.83, p. 4-14. 2003.  
22
- 23 70. RAWAT R.; WHITTY A.; TONGE, P.J. The isoniazid-NAD adduct is a slow,  
24 tight-binding inhibitor of *InhA*, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase:  
25 adduct affinity and drug resistance. **Proc Natl Acad Sci**, Washington, v. 100, p.  
26 13881–13886. 2003.  
27
- 28 71. RIVERA, A.B.; TUPASI, T.E.; GRIMALDO, E.R.; CARDANO, R.C.; CO,  
29 V.M. Rapid and improved recovery rate of *Mycobacterium tuberculosis* in  
30 *Mycobacteria Growth Indicator Tube* combined with solid Löwenstein Jensen  
31 medium. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.**, Paris, v.1, n.5, p.454-459, 1997.  
32

- 1 72. RISKÀ, P.F.; YA, S.; BARDAROV, S.; FREUNDLICH, L.; SARKIS, G.;  
2 HATFULL, G.; *et al.* Rapid film-based determination of antibiotic susceptibilities  
3 of *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a luciferase Reporter Phage and  
4 the Bronx Box. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.4,  
5 p.4663-4664. 2000.  
6
- 7 73. ROSSETI, M.L.; VALIM, A.R.; SILVA, M.S.; RODRIGUES, V.S. Resistant  
8 tuberculosis: a molecular review. **Revista de Saúde Pública**, Rio de Janeiro,  
9 v.36, n.4, p.525-532. 2002.  
10
- 11 74. RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Rev Soc**  
12 **Bras Med Trop**, Uberaba, v. 35, n. 1, p. 51-58. 2002.  
13
- 14 75. RUSCH-GERDES, A.; SAJDUDA, S.; SAMPER, I. G.; SHEMYAKIN, U. B.;  
15 SINGH, A.; SOMOSKOVI, R. A.; SKUCE, D.; VAN SOOLINGEN, E. M.;  
16 STREICHER, P. N.; SUFFYS, E.; TORTOLI, T.; TRACEVSKA, V.; VINCENT, T.  
17 C.; VICTOR, R. M.; WARREN, S. F.; YAP, K.; ZAMAN, F.; PORTAELS, N.  
18 RASTOGI; SOLA, C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity:  
19 mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for  
20 classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiol**, Londres,  
21 v. 6, p. 23. 2006.  
22
- 23 76. SANCHOTENE, K.O.; VON GROLL, A.; RAMOS, D.; SCHOLANTE, A.B.;  
24 HONSCHA, G.; VALENÇA, M.; SCAINI, C. J.; SILVA, P. E. A. Comparative  
25 evaluation of the nitrate reductase assay and the resazurin Microtitre assay for  
26 drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against first line anti-  
27 tuberculosis drugs. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, p.16-  
28 20.  
29
- 30 77. SHAMPUTA, I.C.;RIGOUTS, L.; PORTAELS, F. Molecular genetic methods  
31 for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical  
32 specimens. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica**  
33 **Scandinavica**, Copenhagen, v.112, n.11-12, p.728-752, 2004.

- 1 78. SILVA, A.B.S.S., VON GROLL, A., FÉLIX, C., CONCEIÇÃO, F.R., SPIES,  
2 F.S., SCAINI, C.J., ROSSETTI, M.L.R., BORSUK, S., DELLAGOSTIN, O.A.,  
3 SILVA, P.E.A. Clonal diversity of *M. tuberculosis* isolated in a sea port city in  
4 Brazil. **Tuberculosis**, Fort Collins, v. 98: p. 443-447, 2009.  
5
- 6 79. SILVA, P.A. & AÍNSA, J.A Capítulo 18: Drugs and Drug Interation. In:  
7 Palomino, J. C.; Leão, .C. & Ritacco, V. **Tuberculosis: From Basic Science to**  
8 **Patient Care**. p. 593-634, 2007.  
9
- 10 80. SILVA, P.A.; BOFFO. M.M.S.; MATTOS, I.G.; SILVA, A.B.S.; PALOMINO,  
11 J.C.; MARTIN, A. Comparison of redox and D29 phage methods for detection of  
12 isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical**  
13 **Microbiology and Infection**, Paris, v.12, n.3, p.293-296, 2006.  
14
- 15 81. SILVA, P.A.; MONTAÑES, C.M.; CLAVER, J.A.A. Tuberculose: História e  
16 perspectivas atuais. **Vittalle**, Rio Grande, v.15, n.1, p.71-78, 2003.  
17
- 18 82. SILVA, P. E. A.; WIESEL, F.; BOFFO, M. M.; VON GROLL, A.; MATTOS, I.  
19 G. ; MEJIA, G.; ROBLED0, J. Microcolony detection in thin layer culture as an  
20 alternative method for rapid detection of mycobacterium tuberculosis in clinical  
21 samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 421-423,  
22 2007.  
23
- 24 83. SILVA, P.E.A.; PALOMINO, J.C. Molecular basis and mechanisms of drug  
25 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. **Journal of**  
26 **Antimicrobial Chemoterapy**, Oxford, v.66, p.1417-1430, 2011.  
27
- 28 84. SPIES, F.S; RIBEIRO, A. W.; RAMOS, D. F.; RIBEIRO, M. O.; MARTIN, A.;  
29 PALOMINO, J. C.; ROSSETI, M. L. R.; ALMEIDA, P. E. A.; ZAHA, A.  
30 Streptomycin resistance and lineage-specific polymorphisms in *Mycobacterium*  
31 *tuberculosis* gidB gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.49,  
32 n. 7, p.2625-2630, 2011.  
33

- 1 85. STEINGART KR, HENRY M, LAAL S, HOPEWELL PC, RAMSAY A,  
2 MENZIES D. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis  
3 of pulmonary tuberculosis: a systematic review. **PLoS Med**, Cambridge, v. 4, n.  
4 6. 2007. Erratum in: PLoS Med 2007; 4(8): e254.  
5
- 6 86. STEINGART, K.R., DENDUKURI, N., HENRY, M., SCHILLER, I, NAHID, P.,  
7 HOPEWELL, P.C. Performance of purified antigens for serodiagnosis of  
8 pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. **Clin Vaccine Immunol**, Washington,  
9 v.16, n.2, p.260-276. 2009.  
10
- 11 87. SVS - Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância  
12 em Saúde, Ministério da Saúde. **Plano Estratégico para o Controle da**  
13 **Tuberculose**, Brasil 2007-2015. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.  
14
- 15 88. SYRE H, OVREAS K, GREWAL HMS. Determination of the susceptibility of  
16 *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide in liquid and solid media assessed  
17 by a colorimetric nitrate reductase assay. **Journal of Antimicrobial**  
18 **Chemotherapy**, Oxford, v. 65, n. 4, p.704-712. 2010.  
19
- 20 89. TAKIFF, H.E.; SALAZAR, L.; GUERRERO, C.; *et al.* Cloning and nucleotide  
21 sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of  
22 quinolone resistance mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,  
23 Washington, v. 38, p.773-780. 1994.  
24
- 25 90. TAYLOR, G.M.; STEWART, G.R.; COOKE, M.; CHAPLIN, S.; LADVA S.;  
26 KIRKUP, J.; PALMER, S.; YOUNG, D.B. Koch's Bacillus – a look at the first  
27 isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective.  
28 **Microbiology**, Spencers Wood, n. 149, p. 3213 – 3220. 1999.  
29
- 30 91. TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; SCHMIDHEINI, T.; BODMER,  
31 F. Direct, Automated Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium*  
32 *tuberculosis* by Polymerase Chain Reaction and Single-Strand Conformation

- 1 Polymorphism Analysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,  
2 Washington, v. 37, n.10, p.2054-2058. 1993.  
3
- 4 92. UDWADIA, Z. F.; AMALE, R.A.; AJBANI, K.K.; RODRIGUES, C. Totally  
5 Drug-Resistant Tuberculosis in India. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford,  
6 n.54, p.579-581. 2012.  
7
- 8 93. UEKI, S.Y.M.; MARTINS, M.C.; TELLES, M.A.S.; VIRGILLO, M.C.;  
9 GLAMPAGLIA, C.M.S; CHIMARRA, E.; FERRAZOLI, L. Micobactérias não  
10 tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. **J. Bras.**  
11 **Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 41, n.1, p.1-8. 2005.  
12
- 13 94. VAN SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; DE HASS, P.E.; HERMANS,  
14 P.W.; KOEDAM, M.A.; TEPPEMA, K.S. A novel pathogenic taxon of the  
15 *Mycobacterium tuberculosis* complex, *canetti*: characterization of an exceptional  
16 isolate from Africa. **International journal of systematic bacteriology**, Ames,  
17 v.47, n.4, p.1236-1245. 1997.  
18
- 19 95. VELAYATI, A. A.; MASJEDI, M. R; FARNIA, P.; TABARSI, P.; GHANAVI,  
20 J.; ZIAZARIFI, A. H.; HOFFNER, S. E. Emergence of New Forms of Totally  
21 Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli – Super Extensively Drug-Resistant  
22 Tuberculosis or Totally Drug-Resistant Strains in Iran. **Chest**, Northbrook,  
23 v.136, n.2, p. 420-425. 2009.  
24
- 25 96. VIEDMA, D.G., RODRIGUEZ, N.A., ANDRES, S., SERRANO, M.J.R.,  
26 BOUZA, E. Characterization of Clonal Complexity in Tuberculosis by  
27 Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat  
28 Typing. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.43, p.5660-5664. 2005.  
29
- 30 97. WARREN, R.M., VAN PITTIUS, N.C., BARNARD, M., HESSELING, A.,  
31 ENGELKE, E., DE KOCK, M., GUTIERREZ, M.C., CHEGE, G.K., VICTOR,  
32 T.C., HOAL, E.G., VAN HELDEN, P.D. Differentiation of *Mycobacterium*

- 1 *tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference.  
2 **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, Paris, v. 10, p. 818-822. 2006.  
3
- 4 98. WATTERSON, A.S.; DROBNIEVSKI, F.A. Modern laboratory diagnosis of  
5 mycobacterial infections. **Journal of clinical pathology**, London, v.53, n.10,  
6 p.727-732. 2003  
7
- 8 99. **WHO**. World Health Organization. Toman's tuberculosis: case detection,  
9 treatment, and monitoring. Geneva: World Health Organization; 2004.  
10
- 11 100. **WHO**. World Health Organization. Global Tuberculosis Control:  
12 Surveillance, Planning, Financing. WHO Report (WHO/HTM/TB/2006.362),  
13 Geneva, 2006a.  
14
- 15 101. **WHO**. World Health Organization. Guidelines for the programmatic  
16 management of drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health  
17 Organization; 2006b.  
18
- 19 102. **WHO**. World Health Organization, Global tuberculosis control, 2008a.  
20 Disponível em:  
21 [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2008/pdf/fullreport.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/pdf/fullreport.pdf).  
22 Acessado em: setembro de 2011.  
23
- 24 103. **WHO** - World Health Organization - Policy on Molecular Line Probe  
25 Assays for Rapid Screening of Patients at Risk of Multidrug-Resistant  
26 Tuberculosis, 2008b. Disponível em:  
27 [http://www.who.int/tb/features\\_archive/policy\\_statement.pdf](http://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement.pdf) . Acessado em:  
28 agosto de 2011.  
29
- 30 104. **WHO**. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the  
31 world. Fourth global report. The WHO/IUATLD global project on anti-  
32 tuberculosis drug resistance surveillance, 2002-2007. Geneva: World Health  
33 Organization; 2008c

- 1 105. **WHO**. World Health Organization. Global Tuberculosis Control 2011.  
2 Disponível em:  
3 [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2011/gtbr11\\_full.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf). Acessado  
4 em janeiro de 2012.  
5
- 6 106. YUE, J.; SHI, W.; XIE, J.; LI, Y.; ZENG, E. LIAN, L. Detection of rifamin  
7 resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a specialized  
8 oligonucleotide microarray. **Diagnostic Microbiology and Infectious**  
9 **Disease**, New York, v.48, p.47-54. 2004.  
10
- 11 107. ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; *et al.* The catalase/oxidase gene  
12 and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, Londres, v.  
13 358, p. 591-593. 1992.  
14
- 15 108. ZHANG, Y. The Magic Bullets and Tuberculosis drugs Targets. **Annual**  
16 **review of pharmacology and toxicology**, Palo Alto, v.45, p.529-564. 2005.  
17
- 18 109. ZHANG, Y.; YEW, W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium*  
19 *tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis**, Paris, v. 13, p.1320-1330. 2009  
20
- 21 110. ZIGNOL M., *et al.* **Global incidence of multidrug-resistant**  
22 **tuberculosis**. Abstract for the CDC late-breaker session of the 36th World  
23 Conference on Lung Health, Paris, 2005.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

1 **3. ARTIGO**

2

3

4

**NITRATASE DIRETA: UM MÉTODO NÃO COMERCIAL COMO  
FERRAMENTA PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE MDR E XDR**

5

6

7

8 Fernanda de Souza Abilleira<sup>1</sup>, Anandi Martin<sup>2</sup>, Kristina Fissette<sup>2</sup>, Pedro Eduardo  
9 Juan Carlos Palomino<sup>2</sup> Pedro Eduardo Almeida da Silva<sup>1</sup>

10

11

12 1- Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Faculdade de Medicina, Rio  
13 Grande - Brasil

14

15 2- Mycobacteriology Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerp - Belgium

16

17

18

19

20

21 Pedro Eduardo Almeida da Silva

22 Universidade Federal do Rio Grande

23 Faculdade de Medicina

24 Laboratório de Micobactérias e Biologia Molecular

25 CEP 96200-400, Rio Grande, RS, Brasil

26 Tel 55 53 32330314 Fax 55 53 32338895

27 e-mail: pedrefurg@gmail.com

28

29 Apoio financeiro: este estudo recebeu apoio financeiro do Ministério  
30 Saúde/Brasil e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
31 Tecnológico - CNPq. Processo 133851/2010-9

32

## 1 RESUMO

2

3 **Introdução:** Relatos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a vários  
4 medicamentos estão aumentando globalmente e laboratórios de referência  
5 estão se tornando cada vez mais conscientes da necessidade de testes de  
6 sensibilidade (DST), especialmente devido às falhas no tratamento. O  
7 tratamento da tuberculose multirresistente e extensivamente resistente (MDR-  
8 TB e XDR-TB) é muito mais difícil e dispendioso, sendo a taxa de mortalidade  
9 bastante alta. Durante os últimos anos, devido ao longo tempo requerido pelos  
10 DST convencionais, novas abordagens têm sido propostas para uma detecção  
11 de resistência mais rápida a drogas, tais como o teste da redução do nitrato  
12 (NRA), considerado rápido e barato, tornando-se uma boa ferramenta de  
13 diagnóstico para países com poucos recursos. Neste estudo, foi desenvolvido  
14 um teste colorimétrico rápido como método de DST direto, num formato de  
15 microplaca com meio sólido e avaliado o seu desempenho, em comparação  
16 com o método das proporções (MP) e com a NRA em tubos. **Métodos:** As  
17 amostras de escarro foram descontaminadas e processadas pelo método de  
18 Petroff. A suspensão descontaminada foi utilizada para realizar a NRA direta  
19 (DNRA) em meio 7H11, utilizando 1 ug / ml rifampicina (RIF), 0,2 ug / ml  
20 isoniazida (INH), 2 ug / ml ofloxacina (OFLO), 6 ug / ml canamicina (CAN), 2 ug  
21 / ml amicacina (AMI) e 10 ug / ml Capreomicina (CAP). Os resultados foram  
22 comparados aos obtidos com o MP. **Resultados:** 84 amostras foram testadas e  
23 os resultados para a maioria das amostras estavam disponíveis no prazo de 21  
24 dias. Este estudo mostrou uma concordância global de 98,4% entre o DNRA e  
25 o MP (496 de 504 testes de sensibilidade individuais). A sensibilidade e  
26 especificidade, em comparação com MP, foi de 98,5% e 100% para a INH,  
27 98,3% e 96,2% para a RMP, 91,7% e 100% para CAN, 78,8% e 97,3% para  
28 OFLO, 100% e 100% para AMI e CAP, respectivamente. **Conclusão:** Os  
29 resultados demonstram que a DNRA, neste novo formato, é um método rápido,  
30 preciso e barato para a determinação do perfil de sensibilidade do *M.*  
31 *tuberculosis* e pode tornar-se um método alternativo para as países com  
32 recursos limitados.

33

## 1 Introdução

2

3 A tuberculose (TB) continua sendo um dos principais problemas de  
4 saúde pública no mundo, especialmente em países em desenvolvimento. Este  
5 quadro é agravado pelo aumento da incidência da TB multirresistente (MDR-  
6 TB), causada por cepas resistentes ao menos à isoniazida (INH) e rifampicina  
7 (RMP) e extensivamente resistente (XDR-TB) causada por cepas MDR,  
8 acrescida de resistência a uma fluoroquinolonas e ao menos a um dos  
9 seguintes antimicrobianos: canamicina (CAN), amicacina (AMI) e capreomicina  
10 (CAP). A TB causada por cepas resistentes aos antimicrobianos necessita de  
11 um esquema terapêutico de alto custo e menos efetivo do que o de primeira  
12 linha (1).

13

14 A estimativa de MDR-TB em 2008 era de 440 mil casos, sendo que em  
15 2010, apenas 290 mil foram notificados oficialmente. Menos de 5% dos  
16 pacientes novos e previamente tratados foram testados para MDR-TB na  
17 maioria dos países. Embora o número de pacientes em tratamento tenha  
18 aumentado em 2010, chegando a alcançar 46 mil, isto significa apenas 16%  
19 do total de casos de MDR-TB notificados no mundo todo (WHO, 2011). Até  
20 julho de 2010, 58 países e territórios notificaram pelo menos um caso de XDR-  
21 TB e países como Irã, Índia e Itália relataram casos de TB resistente à todos  
22 os antimicrobianos (TDR-TB) (17, 24, 25, 27).

23

24 Em países com recursos limitados, onde a TB é endêmica e a MDR-TB  
25 é um sério e crescente problema de saúde pública, os testes de sensibilidade  
26 (DST) ainda são baseados nos métodos convencionais de cultura em meio  
27 sólido como LJ e ágar Middlebrook, que são laboriosos e demorados,  
28 necessitando de pelo menos 4 semanas de incubação, após o isolamento  
29 primário, para que uma cepa seja considerada sensível ou resistente. O  
30 desenvolvimento de um teste alternativo, rápido e de baixo custo, que possa  
31 ser feito a partir do escarro, é de extrema importância para os programas de  
32 controle da TB e permitirá uma rápida detecção de novos casos bem como o  
33 monitoramento de pacientes portadores de TB com cepas resistentes (19).

1 O teste da redução do nitrato (NRA) é baseado na habilidade do *M.*  
2 *tuberculosis* em reduzir o nitrato a nitrito, cuja presença é facilmente detectada  
3 por reagentes específicos, utilizando o método de Griess , o que produz uma  
4 alteração da coloração no meio (3).

5  
6 O objetivo deste estudo foi avaliar a performance da NRA, em placas,  
7 de forma direta (DRNA), em determinar a suscetibilidade do *M. tuberculosis*, a  
8 partir de amostras de escarro, frente a INH,RIF, Ofloxacina (OFLO), CAN, AMI  
9 e CAP.

## 10 11 **Materiais e métodos**

### 12 13 **Amostras**

14  
15 Este estudo foi realizado na Unidade de Micobacteriologia do Instituto de  
16 Medicina Tropical da Antuérpia (ITM), Bélgica. Durante cinco meses, de  
17 fevereiro a junho de 2011, um total de 84 amostras de escarro congeladas  
18 foram selecionadas da coleção do ITM.

19  
20 As amostras foram descontaminadas pelo método de Petroff (21).  
21 Resumidamente, um volume aproximado de 2 ml de escarro foi  
22 descontaminado com igual volume de solução de NaOH 4%. Os tubos  
23 contendo as amostras foram colocados durante 15 minutos em estufa  
24 bacteriológica 36°C+/-1°C para que houvesse a fluidificação da amostra. Após  
25 esse tempo, completa-se o volume do tubo com água destilada estéril e goteja-  
26 se q solução neutralizante (HCl 1N) até que se obtivesse coloração âmbar.  
27 Feito isto, os tubos eram centrifugados por 15 minutos a 3.000g, sendo o  
28 sobrenadante desprezado e o pellet ressuscitado em 1 ml de água destilada  
29 estéril.

30  
31  
32  
33

## 1 **Método das Proporções**

2

3 O Método das Proporções (MP) foi realizado de forma indireta, a partir  
4 das cepas isoladas das amostras de escarro, na ocasião da sua chegada ao  
5 laboratório. A técnica foi realizada em meio LJ seguindo o método simplificado,  
6 descrito por Canetti, Rist e Grosset (1969) em tubos Falcon de 15 ml, com ou  
7 sem adição de antibióticos. As concentrações de antibióticos utilizadas foram:  
8 40 µg/ml RIF, 0.2 µg/ml INH, 2 µg/ml OFLO, 20 µg/ml CAN, 40 µg/ml AMI e 20  
9 µg/ml CAP. Os valores de proporção crítica adotados foram de 1% para todos  
10 os antibióticos (6).

11

12 Para cada cepa, era feita uma suspensão bacteriana, transferindo-se  
13 colônias de bactéria para um tubo com pérolas de vidro e 2,5 ml de água  
14 destilada estéril. Parte desta suspensão era diluída em 1:100 e 200 µl desta  
15 diluição eram inoculados em LJ sem antibiótico, enquanto 200 µl da suspensão  
16 não diluída eram inoculados em LJ com antibiótico. Os tubos eram incubados à  
17 37°C por 28 dias, quando se fazia a primeira leitura. Caso não houvesse  
18 crescimento suficiente para a interpretação de resultados, realizava-se uma  
19 segunda leitura aos 42 dias de incubação. A cepa era considerada resistente  
20 se a proporção entre o crescimento dos tubos com antibiótico e controle fosse  
21 superior a 1%. Os resultados obtidos pelo MP foram utilizados como padrão  
22 ouro para comparar com os resultados da DNRA (6).

23

## 24 **DNRA em placa**

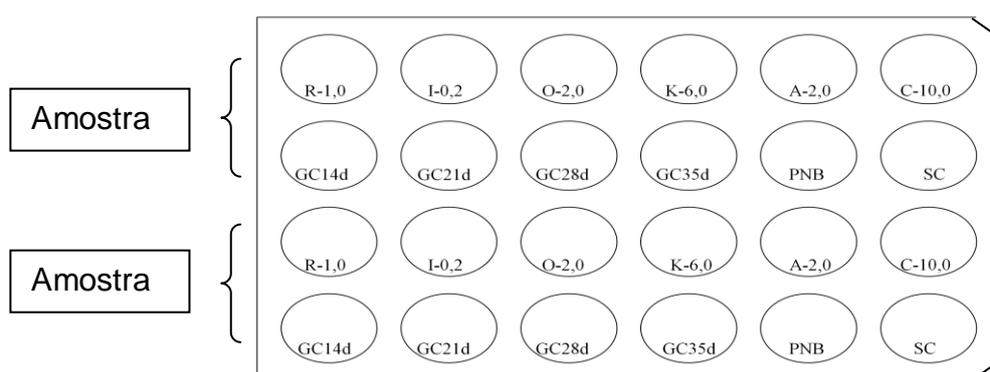
25

26 O método indireto proposto por Ängeby *et al.* (2002) (3) foi utilizado  
27 como modelo, tendo sido utilizado com modificações no formato, meio de  
28 cultura, concentração dos antibióticos e número de controles. Usamos uma  
29 microplaca de 24 poços, com 2 ml de 7H11, nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) numa  
30 concentração de 1 mg/ml e antibióticos incorporados ou não em cada poço. As  
31 concentrações de antibióticos utilizadas foram: 1 µg/ml RMP, 0,2 µg/ml INH, 2  
32 µg/ml OFLO, 6 µg/ml CAN, 2 µg/ml AMI, 10 µg/ml CAP e 25 µg/ml Ácido p-  
33 nitrobenzóico (PNB).

1 Após a descontaminação da amostra e ressuspensão do pellet,  
 2 adicionava-se água destilada estéril até completar o volume de 3 ml, sendo  
 3 esta a solução de trabalho (ST), que era inoculada nos poços testes e uma  
 4 diluição da ST de 1:10 era feita, a qual chamávamos solução diluída (SD), que  
 5 era inoculada nos poços controle.

7 Para cada amostra, 200 µl da ST eram inoculados nos poços teste,  
 8 contendo 7H11, KNO<sub>3</sub> e os antibióticos e 200 µl da SD eram inoculados nos  
 9 poços controle, que continham somente o meio de cultura e o KNO<sub>3</sub>. O controle  
 10 de esterilidade era feito inoculando-se 200 µl de água em um poço controle.

12 A placa era incubada à 37°C, dentro de um saco plástico fechado. Após  
 13 14 dias 0,5 ml do reagente de Griess recém misturado (1 parte de ácido  
 14 clorídrico 50%, 2 partes de 0,2% sulfanilamida e 2 partes de 0,1% n-1-naftil-  
 15 etilenodiamina) foi adicionado a um dos poços controles. Se houvesse qualquer  
 16 mudança de cor (rosa pálido – rosa forte), os poços testes eram também  
 17 revelados. Se não houvesse mudança de cor no poço controle, a placa era  
 18 reincubada e o procedimento era repetido aos 21, 28 ou 35 dias. Uma amostra  
 19 era considerada resistente à certa droga se a mudança de cor no poço teste  
 20 fosse igual ou superior ao poço controle. O desenho da placa pode ser visto na  
 21 Figura 1.



22  
 23 \*R-Rifampicina / I-Isoniazida / O-Ofloxacina / K-Canamicina/ A-Amicacina/ C-Capreomicina / PNB- ácido p-  
 24 nitrobenzólico

25 \*\*Concentração dos antibióticos - µg/ml      \*\*\*GC – Controle/ SC – Control de esterilidade

26  
 27  
 28

## 1 **DNRA em tubos**

2

3 A DNRA em tubos foi realizada em meio LJ seguindo também o modelo  
4 proposto por Ängeby *et al.* (2002) (3), utilizando tubos Falcon de 15 ml, com  
5 nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) numa concentração de 1 mg/ml, com ou sem adição  
6 de antibióticos. As concentrações de antibióticos utilizadas foram: 40 µg/ml  
7 RMP, 0.2 µg/ml INH, 2 µg/ml OFLO e 20 µg/ml CAN. Para cada amostra, 200 µl  
8 da ST eram inoculados nos tubos contendo LJ, KNO<sub>3</sub> e os antibióticos e 200 µl  
9 da SD eram inoculados nos tubos controle, que continham somente o meio de  
10 cultura e o KNO<sub>3</sub>.

11

12 Os tubos eram colocados horizontalmente à temperatura ambiente por  
13 24 horas, sendo incubados à 37°C em posição vertical até completar 14 dias.  
14 Passado este tempo, 0,5 ml do reagente de Griess, recém misturado, era  
15 adicionado a um tubo controle. Se houvesse qualquer mudança de cor (rosa  
16 pálido – rosa forte), os tubos correspondentes contendo antibióticos eram  
17 também revelados. Se não houvesse mudança de cor, os tubos eram  
18 reincubados e o procedimento era repetido aos 21, 28 ou 35 dias. Uma  
19 amostra era considerada resistente à certa antibiótico se a mudança de cor no  
20 tubo fosse igual ou superior ao tubo controle.

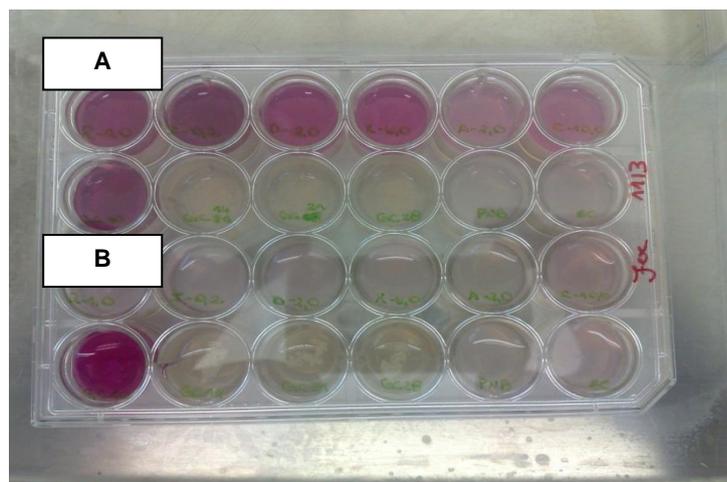
21

## 22 **Resultados**

23

24 Das 94 amostras escolhidas, a DRNA em placas foi realizada em 84  
25 amostras de escarro, uma vez que 10 (10,6%) contaminaram. Os resultados de  
26 18 (21,4%), 58 (69,05%), 6 (7,14%) e 2 (2,4%) amostras foram obtidos após  
27 14, 21, 28 e 35 dias respectivamente e estes resultados foram comparados  
28 com os produzidos pela DNRA em tubos e MP. A DRNA em placas era de fácil  
29 leitura, um exemplo de amostras resistentes e sensíveis pode ser vista na  
30 Figura 2.

31



1

2 Figura 2 - Exemplo de DRNA em placa. Amostra A totalmente resistente e amostra B  
3 totalmente sensível

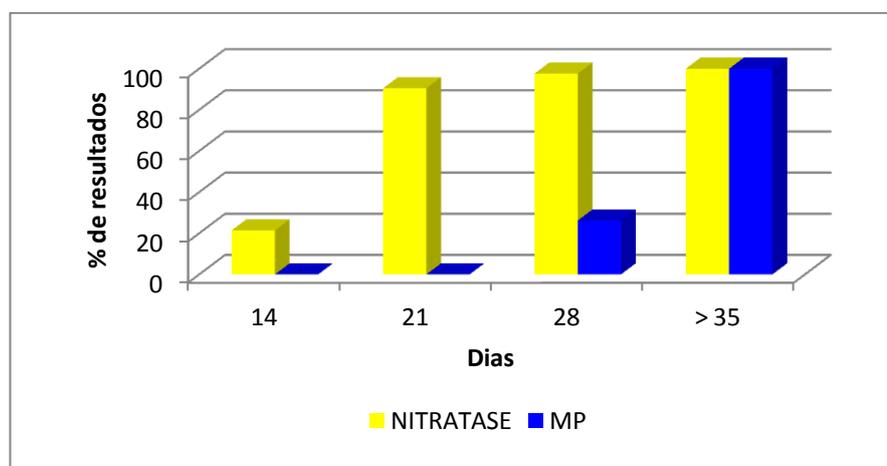
4

5         Dentre estas 94 amostras, a DRNA em tubos foi realizada também em  
6 84 amostras de escarro, sendo que 9 (9,6%) contaminaram e em 1 (1,1%) não  
7 houve crescimento. Os resultados de 12 (14,29%), 40 (47,62%), 29 (34,52%) e  
8 3 (3,57%) amostras foram obtidos após 14, 21, 28 e 35 dias, respectivamente.

9

10         Com relação ao MP, obtivemos resultados de 22 (26,2%) amostras em  
11 28 dias e de 62 amostras (73,8%) em 42 dias e, tendo este sido executado de  
12 forma indireta, soma-se a esse tempo os 21 dias, em média, para o  
13 crescimento das cepas, totalizando 49 ou 63 dias até a obtenção do resultado  
14 do teste de sensibilidade. Uma comparação tempo até a obtenção dos  
15 resultados pode ser visto na Figura 3.

16



17

18 Fig 3. Percentual cumulativo de resultados positivos pelos métodos da DNRA em placas e MP

19

1 A comparação da DNRA em placas e o MP (Tabela 1) mostra uma  
 2 concordância de 98,4% (496 de 504 testes de sensibilidade individuais). Uma  
 3 concordância completa foi encontrada nos resultados da AMI e CAP.  
 4 Considerando as amostras discordantes, a sensibilidade e especificidade foram  
 5 de 98,5% e 100% para INH, 98,3% e 96,2% para RIF, 91,7% e 100% para  
 6 CAN, 78,8% e 97,3% para OFLO, 100% e 100% for AMI e 100% e 100% para  
 7 CAP. Com relação à DNRA em tubos, a sensibilidade e especificidade foram  
 8 de 100% e 100% para INH, 100% e 96,3% para RIF, 91,7% e 100% para CAN,  
 9 78,8% e 97,3% para OFLO. Obtivemos uma excelente concordância entre os  
 10 dois formatos de DNRA para todos os antibióticos, com um valor Kappa de  
 11 0,96 para INH, 0,97 para RIF, 1,0 para CAN e OFLO (Tabela 2). Com relação  
 12 ao MP, obtivemos um valor Kappa de 0,96 para INH, 0,94 para RIF, 0,95 para  
 13 CAN, 0,75 para OFLO e 1,0 para AMI e CAP.

14 A acurácia da DNRA em placas, em relação ao padrão ouro, foi de  
 15 98,8% para INH; 97,6% para RIF; 98,8% para CAN; 95,2% para OFLO e 100%  
 16 para AMI e CAP. No anexo 1 encontra-se uma tabela com o resultado da  
 17 DNRA em placas, DNRA em tubos e MP para todas as 84 amostras estudadas.

18  
 19  
 20  
 21

Tabela 1 –sensibilidade e especificidade do teste de suscetibilidade direta em 84 amostras de escarro pelos métodos da nitratase em placas e das proporções

Antibióticos	Método das proporções	DNRA em placas				Valor Kappa
		N°		%		
		Resistente	Sensível	Sensibilidade	Especificidade	
INH	Resistente	67	1	98.5	100	0.96
	Sensível	0	16			
RIF	Resistente	57	1	98.3	96.2	0.94
	Sensível	1	25			
OFLO	Resistente	7	2	78.8	97.3	0.75
	Sensível	2	73			
CAN	Resistente	11	1	91.7	100	0.95
	Sensível	0	72			
AMI	Resistente	4	0	100	100	1.0
	Sensível	0	80			
CAP	Resistente	7	0	100	100	1.0
	Sensível	0	77			

1 Tabela 2 – Concordância dos resultados do teste de suscetibilidade direta em 84  
 2 amostras de escarro pelos métodos da nitratase em placas e em tubos  
 3

Antibióticos	DNRA em tubos	DNRA em placas		Valor Kappa
		Resistente	Sensível	
INH	Resistente	67	1	0.96
	Sensível	0	16	
RIF	Resistente	57	1	0.97
	Sensível	0	26	
OFLO	Resistente	9	0	1.0
	Sensível	0	75	
CAN	Resistente	11	0	1.0
	Sensível	0	73	

4

## 5 Discussão

6

7 Em países com poucos recursos, particularmente naqueles onde a  
 8 carga de TB causada por cepas resistentes é alta, existe uma necessidade  
 9 urgente de testes de sensibilidade para os fármacos de primeira e segunda  
 10 linhas usados no tratamento da TB. Estes métodos devem ser de fácil  
 11 execução, apresentar resultados rápidos e acurados além de serem de baixo  
 12 custo (2).

13

14 A NRA, baseada na habilidade do *M. tuberculosis* em reduzir o nitrato a  
 15 nitrito, cuja presença é facilmente detectada por reagentes específicos. Neste  
 16 estudo, pela primeira vez, avaliou-se a sensibilidade do *M. tuberculosis* frente  
 17 aos fármacos de primeira e segunda linhas simultaneamente pelo método da  
 18 NRA, em placa ou em tubo (3).

19

20 Embora a DNRA seja um método bastante conhecido, esse formato em  
 21 placa que este estudo propõe é novo e suas principais vantagens são o  
 22 tamanho compacto (fator bastante importante para países com baixos

1 recursos, cujas instalações laboratoriais frequentemente são precárias e não se  
2 dispõe de muito espaço) e a detecção rápida de cepas MDR, XDR ou TDR (7,  
3 13). Associado a isso, devemos citar as vantagens do método em si, como a  
4 redução do tempo até o diagnóstico, por se tratar de um método direto, sendo  
5 realizado a partir do escarro, cujo resultado se baseia na evidência da  
6 redução do nitrato como sinal de crescimento bacteriano, o que é mais rápido  
7 que a visualização das colônias; o baixo custo e a facilidade para sua execução  
8 (23, 19), não havendo a necessidade de equipamentos especiais ou reagentes  
9 caros e a maior biossegurança, uma vez que não há a necessidade de  
10 realização das diluições seriadas, como no MP, gerando assim uma quantidade  
11 menor de aerossóis, fato que também pode-se atribuir à utilização de meio  
12 sólido (22)

13

14 Uma desvantagem do método clássico, quando executado em LJ, é a  
15 exposição dos antibióticos à altas temperaturas durante a coagulação do meio,  
16 o que pode diminuir a eficiência destes (14). Tendo em vista isto, optamos pela  
17 utilização do meio 7H11, sabidamente mais enriquecido que o LJ e que não  
18 necessita de coagulação. Como forma de diferenciar o *M. tuberculosis* de  
19 outras espécies de micobactérias foi incluído PNB em um dos poços, uma vez  
20 que o crescimento do complexo *M. tuberculosis* é inibido por esta droga,  
21 enquanto que as micobactérias não tuberculosas (MNT) são resistentes (5).  
22 Para descartar contaminantes, as culturas eram observadas a cada 2 dias para  
23 verificar o possível crescimento.

24

25 A possível interação entre os antibióticos e o  $\text{KNO}_3$  é ainda  
26 desconhecida e deve ser levada em consideração para futuras avaliações(13).

27

28 Neste estudo, aproximadamente 69% dos resultados da DNRA em  
29 placas foi obtido após 21 dias de incubação, contra 48% dos resultados da  
30 DNRA em tubos, o que talvez seja explicado pelo fato do método em placas  
31 ser realizado em 7H11, meio mais enriquecido que o LJ que foi utilizado no  
32 método em tubos, favorecendo assim o crescimento mais rápido das amostras.  
33 Isto representa uma redução de tempo significativa, uma vez que os resultados

1 do MP, executado de forma indireta, são obtidos após 50 dias, em média, após  
2 sua chegada ao laboratório, já que são necessários 21 a 28 dias para o  
3 isolamento da cepa e 28 a 42 dias para o teste de sensibilidade.

4

5 A DNRA pode ser empregada em amostras com baciloscopia  
6 fracamente positiva (+1 e +2), ao contrário do método das proporções direto  
7 (2). No presente estudo, obtivemos excelentes resultados para as três classes  
8 de baciloscopia (+1, +2 e +3).

9

10 O índice de contaminação da DRNA em placas foi de cerca de 10%,  
11 contra 9,6% do método em tubos, sendo esta diferença estatisticamente  
12 insignificante. Um maior índice de contaminação era esperado devido ao fato  
13 de estarmos executando o método diretamente das amostras de escarro.  
14 Levamos em consideração também que a manipulação da placa por quatro  
15 vezes até a obtenção do resultado, já que testávamos os controles aos 14, 21,  
16 28 e 35 dias, pudesse contribuir para o aumento da contaminação. Como  
17 tratava-se de um modelo experimental, optamos por quatro controles, o que  
18 pode vir a ser diminuído no futuro, uma vez que se realize mais testes. Deve-se  
19 salientar que as amostras contaminadas foram as mesmas para ambos os  
20 formatos de NRA. As amostras que não apresentaram crescimento podem ter  
21 sofrido uma descontaminação excessiva ou terem sido armazenadas por um  
22 longo tempo.

23

24 Como mostrado na Tabela 1, houve uma excelente concordância entre a  
25 DRNA e o MP para cinco dos seis antibióticos testadas. Destaca-se o  
26 excelente desempenho do método para INH, RIF e CAN com sensibilidade de  
27 98,5%, 98,3% e 91,7%, especificidade de 100%, 96,2% e 100% e valor kappa  
28 de 0,96, 0,92 e 0,95 respectivamente. Isto é muito importante pois a INH,  
29 juntamente com a RIF são os fármacos mais utilizados no tratamento da TB e  
30 observa-se que a resistência a RIF normalmente vem acompanhada da  
31 resistência a INH, caracterizando assim uma MDR-TB (22). Para AMI e CAP  
32 obtivemos 100% de concordância com o MP. Para a OFLO, o resultado da  
33 sensibilidade não foi tão bom, ficando em 78,8%. Entretanto, a especificidade

1 manteve-se excelente, ficando em 97,3%. Ao observarmos a acurácia do  
2 método para esta droga específica, verificamos que o resultado foi de 95,2%.  
3 Podemos concluir então que um pequeno número de amostras discordantes  
4 prejudicou a análise do teste para esta droga, uma vez que o número de  
5 amostras resistentes à OFLO testadas foi pequeno.

6

7 O alvo principal das fluoroquinolonas é a DNA girase, uma  
8 topoisomerase do tipo II composta por duas subunidades A e duas  
9 subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente.  
10 Mutações nas regiões que determinam a resistência às quinolonas desses  
11 genes é o mecanismo primário de desenvolvimento da resistência às  
12 fluoroquinolonas (18). As mutações em *gyrA* tem sido identificadas em uma alta  
13 proporção de cepas resistentes a OFLO e mutações em *gyrB* são encontradas  
14 em menor mas não negligenciável número de isolados resistentes a OFLO  
15 (18).

16

17 Geralmente duas mutações em *gyrA* ou mutações concomitantes em  
18 *gyrA* e *gyrB* são necessárias para o desenvolvimento de um nível maior de  
19 resistência (28).

20

21 Devemos considerar também que as cepas resistentes podem  
22 apresentar atividade metabólica menor, o que pode afetar os níveis de  
23 expressão das enzimas responsáveis pela redução do nitrato. Estas cepas  
24 podem ter um baixo nível de resistência que não pode ser detectado pela NRA  
25 (26).

26

27 Em testes futuros pode-se, além de aumentar o número de amostras  
28 resistentes à OFLO, testar outras concentrações do fármaco para verificarmos  
29 melhor seu desempenho, uma vez que o nível de resistência das cepas em  
30 questão pode ser baixo e estar próximo ao ponto de corte definido para o teste.  
31 Sugere-se também realizar o sequenciamento das cepas paralelamente para  
32 verificação do nível de resistência.

32

1 Na tabela 2 podemos observar a excelente concordância entre os dois  
2 formatos da NRA, onde obtivemos apenas duas amostras discordantes. O  
3 método em tubos apresentou uma sensibilidade e especificidade ligeiramente  
4 maior que o método em placas, mas deve-se ressaltar que o método em tubos  
5 já vem sendo amplamente testado e tem protocolo bem definido (3, 7, 10, 11,  
6 13, 15, 16, 19) .

7

8 Os resultados encontrados neste estudo corroboram com achados  
9 anteriores realizados com a DNRA (1, 2, 4, 8, 9, 12, 16, 19, 22, 23, 26) onde  
10 somente INH, RIF, STR e EMB foram testados, tendo a sensibilidade e  
11 especificidade variado de 87%-100%, 87,5%-100%, 66,6%-100%, 55%-100%,  
12 respectivamente.

13

14 A DNRA é um método fenotípico e portanto independe da base  
15 molecular da resistência para a sua acurácia, ao contrário de métodos  
16 moleculares que podem falhar ao não prever alguma mutação que esteja  
17 envolvida com a resistência.

18

19 Nosso estudo sugere que, embora haja a necessidade de estudos  
20 posteriores, incluindo maior número de amostras, a DRNA constitui uma  
21 ferramenta útil para o controle da TB multi-resistente na medida que possibilita,  
22 com rapidez e acurácia, a determinação do perfil de sensibilidade diretamente  
23 da amostra clínica de fármacos de segunda linha, marcadores de TB-XDR.  
24 Estes fatores permitem que a detecção de resistência possa ser executada  
25 inclusive em laboratórios com poucos recursos, devido a sua facilidade de  
26 execução, baixo custo e a não necessidade de equipamentos sofisticados

27

## 28 **Referências**

29

30 **1. Affolabi D, Odoun M, Martin A, Palomino JC, Anagonou S, Portaels F.**  
31 Evaluation of direct detection of Mycobacterium tuberculosis rifampin resistance  
32 by a nitrate reductase assay applied to sputum samples in Cotonou, Benin.  
33 2007. J. Clin. Microbiol. **45** (7): 2123-2125.

34

- 1 **2. Affolabi D, Odoun M, Sanoussi N, Martin A, Palomino C, Kestens L, A**  
2 **nagonou S, Portaels F.** 2008. Rapid and inexpensive detection of multidrug  
3 resistant tuberculosis with the nitrate reductase assay using liquid medium and  
4 applied directly to sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* **46**(10): 3243-3245.  
5
- 6 **3. Ängeby K A, Klintz L, Hoffner S E.** 2002. Rapid and inexpensive drug  
7 susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase  
8 assay. *J. Clin. Microbiol.* **40** (2): 553-555.  
9
- 10 **4. Ani, A E, Dalyop Y B, Agbaji O, Idoko J.** 2009. Drug susceptibility test of  
11 *Mycobacterium tuberculosis* by nitrate reductase assay. *J. Infect. Developing*  
12 *Countries.* **3**(1):16-19.  
13
- 14 **5. Barreto A M W, Caldas P C S, Santos L M, Martins F M, Medeiros R F M.**  
15 2006. Avaliação do ácido p-nitrobenzóico para identificação do complexo  
16 *Mycobacterium tuberculosis* no sistema MB/BacT. *Bol. Pneumol. Sanit.*  
17 **14**(1):17-19.  
18
- 19 **6. Canetti G, Rist N, Grosset J.** 1963. Mesure de la sensibilité du bacille  
20 tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. *Revue*  
21 *Tuberc. Pneumol.* **23**: 217-272.  
22
- 23 **7. Coban A Y, Birinci A, Ekinci B, Durupinar B.** 2004. Drug susceptibility  
24 testing of *Mycobacterium tuberculosis* with nitrate reductase assay. *Int. J.*  
25 *Antimicrob. Agents.* **24**:106-108.  
26
- 27 **8. Gupta A, Anupurba S.** 2010. Direct drug susceptibility testing of  
28 *Mycobacterium tuberculosis* against primary anti-TB drugs in northern India. *J.*  
29 *Infect. Dev. Ctries.* **4**(11):695-703.  
30
- 31 **9. Gupta M, Singh N P, Kaur I R.** 2010. Evaluation of nitrate reductase assay  
32 for direct detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: rapid and

- 1 inexpensive method for low-resource settings. *Indian J. Med. Microbiol.* **28**(4):  
2 363-365.  
3
- 4 **10. Kumar M, Khan I A, Verma V, Kalyan N, Qazi G N.** 2005. Rapid,  
5 inexpensive MIC determination of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using  
6 microplate nitrate reductase assay. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.* **53**:121-124.  
7
- 8 **11. Lemus D, Montoro E, Echemendía M, Yzquierdo S L, Martin A, Portaels**  
9 **F, Palomino J C.** 2005. New methods for the detection of resistance in  
10 *Mycobacterium tuberculosis*. *Biotec. Apl.* **22**(4):309-311.  
11
- 12 **12. Mandal P K, Basnyat S, Khadka D K, Bhatta D R.** 2010. Evaluation of  
13 nitrate reductase assay (NRA) for rapid detection of drug resistant tuberculosis  
14 of national tuberculosis center, Nepal. *Saarc J. Tuber. Lung Dis. HIV/AIDS*  
15 **7**(1):26-30.  
16
- 17 **13. Martin A, Montoro E, Lemus D, Simboli N, Morcillo N, Velasco M,**  
18 **Chauca J, Barrera L, Ritacco V, Portaels F, Palomino J C.** 2005. Multicenter  
19 evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of  
20 *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Microb. Met.* **63**:145-150.  
21
- 22 **14. Martin A, Morcillo N, Lemus D, Montoro E, Silva Telles, M A, Simboli,**  
23 **N.** 2005. Multicenter study os MTT and resazurin assays for testing  
24 susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*  
25 **9**(8):901-906.  
26
- 27 **15. Martin A, Palomino J C, Portaels F.** 2005. Rapid detection of ofloxacin  
28 resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by two low cost colorimetric methods:  
29 resazurin and nitrate reductase assays. *J. Clin. Microbiol.* **43**(4):1612-1616.  
30
- 31 **16. Martin A, Panaiotov S, Portaels F, Hoffner S, Palomino J C, Ängeby K.**  
32 2008. The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and

- 1 rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and  
2 meta-analysis. J. Antimicrob. Chem. **62**:56-64.  
3
- 4 **17. Migliori GB, De Iaco G; Besozzi G, Centis R; Cirillo DM.** 2007. First  
5 tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. Euro Surveill. **12**  
6 (20): pii 3194.  
7
- 8 **18. Mokrousov I, Otten T, Manicheva O, Potapova Y, Vishnevsky B,**  
9 **Narvskaya O, Rastogi N.** 2008. Molecular characterization of ofloxacin-  
10 resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. Antimicrob Agents  
11 Chemother **52**: 2937–2939.  
12
- 13 **19. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino J**  
14 **C.** 2005. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test  
15 and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical  
16 isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Antimicrob. Chem. **55**: 500-505.  
17
- 18 **20. Musa H R, Ambroggi M, Souto A, Ängeby K A.** 2005. Drug susceptibility  
19 testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied  
20 directly on microscopy-positive sputum samples. J. Clin. Microbiol. **43**(7): 3159-  
21 3161.  
22
- 23 **21. Pan American Health Organization.** 1973. Manual de bacteriología de la  
24 TBC: técnicas y procedimientos básicos. OPS, Washington, D.C.  
25
- 26 **22. Shikama M L, Silva, R F, Villela G, Sato D N, Martins M C, Giampaglia C**  
27 **M S, Silva R F A M, Silva P F, Telles M A S, Martin A, Palomino J C.** 2009.  
28 Multicentre study of nitrate reductase assay for rapid detection of rifampicin-  
29 resistant *M. tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung Dis. **13**(3): 377-380.  
30
- 31 **23. Solis L A, Shin S S, Han L L, Llanos F, Stowell M, Sloutsky A.** 2005.  
32 Validation of a rapid method for detection of *M. tuberculosis* resistance to  
33 isoniazid and rifampin in Lima, Peru. Int. J. Tuberc. Lung Dis. **9**(7):760-764.

- 1 **24. Udwardia Z F, Amale R A, Ajbani, K K, Rodrigues C.** 2012. Totally Drug-  
2 Resistant Tuberculosis in India. Clin. Infec. Dis. **54**: 579-581.  
3
- 4 **25. Velayati A A, Masjedi M R, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, Ziazarifi A H,**  
5 **Hoffner S E.** 2009. Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant  
6 Tuberculosis Bacilli – Super Extensively Drug-Resistant Tuberculosis or Totally  
7 Drug-Resistant Strains in Iran. Chest. **136**(2): 420-425.  
8
- 9 **26. Visalakshi P, Meharwal S K, Myneedu V P, Behera D.** 2010. Evaluation of  
10 direct method of drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to  
11 rifampicin and isoniazid by nitrate reductase assay in a national reference  
12 laboratory. Diag. Microb. Infec. Dis. **66**:148-152.  
13
- 14 **27. World Health Organization.**Global Tuberculosis Control 2011. World  
15 Health Organization, Geneva, Switzerland.  
16 [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2011/gtbr11\\_full.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf).  
17
- 18 **28. Zhang Y, Yew W W.** 2009. Mechanisms of drug resistance in  
19 *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis **13**:1320-1330.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

#### 1 4. CONCLUSÕES

- 2
- 3 • O tempo até a obtenção dos resultados da determinação do perfil de
- 4 sensibilidade com a DNRA foi reduzido em cerca de 40 dias, com
- 5 relação ao padrão ouro.
- 6
- 7 • A sensibilidade e especificidade encontradas pelo método DNRA neste
- 8 novo formato, foram significativas, exceto para OFLO.
- 9
- 10 • Os resultados encontrados neste estudo corroboram com achados
- 11 relatados em estudos semelhantes anteriores.
- 12
- 13 • Embora haja a necessidade de estudos posteriores, incluindo maior
- 14 número de amostras, a DRNA apresenta-se como uma ferramenta útil
- 15 para o controle da TB multirresistente na medida que possibilita, com
- 16 rapidez e acurácia, a determinação do perfil de sensibilidade
- 17 diretamente da amostra clínica de fármacos de segunda linha,
- 18 marcadores de TB-XDR.
- 19
- 20 • Este método pode ser executado inclusive em laboratórios com poucos
- 21 recursos, devido a sua facilidade de execução, baixo custo e a não
- 22 necessidade de equipamentos sofisticados.
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

## ANEXO 1

Tabela com os resultados do MP, DNRA em tubos e DNRA em placas

- 1 Anexo 1 – Tabela com os resultados do MP, DNRA em tubos e DNRA em  
 2 placas para as 84 amostras estudadas  
 3

Amostra	Resistência MP	Resistência DNRA tubos	Resistência DNRA placas
01	IRKOC	IRKO	IRKOC
02	-	O	O
03	-	-	-
04	-	-	-
05	I	I	I
06	IR	IR	IR
07	-	-	-
08	I	I	I
09	IRKOC	IRKO	IRKOC
10	I	I	I
11	I	IRO	IRO
12	I	I	I
13	-	-	-
14	IRKC	IRK	IRKC
15	IRKOC	IRKO	IRKOC
16	IRKO	IRKO	IRKO
17	IR	IR	IR
18	I	I	I
19	IR	IR	IR
20	IR	IR	IR
21	-	-	-
22	IR	IR	IR
23	IR	IR	IR
24	R	R	R
25	R	R	R
26	IR	IR	IR
27	IR	IR	IR
28	IRO	IR	IR
29	IR	IR	IR
30	IR	IR	-
31	-	-	-
32	IR	IR	IR
33	IRK	IRK	IRK
34	IR	IR	IR
35	IR	IR	IR
36	I	I	I
37	IRKAC	IRK	IRKAC
38	-	-	-
39	IR	IR	IR
40	I	I	I
41	IR	IR	IR
42	I	I	I

Amostra	Resistência MP	Resistência DNRA tubos	Resistência DNRA placas
43	I	I	I
44	I	I	I
45	I	I	I
46	IR	IR	IR
47	-	-	-
48	IR	IR	IR
49	-	-	-
50	I	I	I
51	IRKC	IRK	IRKC
52	I	I	I
53	RKA	RK	RKA
54	RKA	RK	RKA
55	-	-	-
56	IR	IR	IR
57	IRKO	IR	IR
58	IRO	IRO	IRO
59	IRKOAC	IRKO	IRKOAC
60	IR	IR	IR
61	IR	IR	IR
62	IR	IR	IR
63	IR	IR	IR
64	IR	IR	IR
65	IR	IR	IR
66	IR	IR	IR
67	IR	IR	IR
68	IR	IR	IR
69	IR	IR	IR
70	IR	IR	IR
71	IR	IR	IR
72	IR	IR	IR
73	IR	IR	IR
74	IR	IR	IR
75	IR	IR	IR
76	IR	IR	IR
77	IR	IR	IR
78	IR	IR	IR
79	IR	IR	IR
80	IRO	IRO	IRO
81	IR	IR	IR
82	IR	IR	IR
83	IR	IR	IR
84	-	-	-

- 1 \*I - Isoniazida / R - Rifampicina / K - Canamicina / O - Ofloxacina / A -
- 2 Amicacina / C - Capreomicina/ - Sem resistência
- 3 \*\* Em cinza as amostras discordantes