

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CAMPUS DE ARARAQUARA

Trabalho de Conclusão de Curso

“Pesquisa de genes de resistência do *M. tuberculosis* a isoniazida e rifampicina por sequenciamento e pela tecnologia de DNA-STRIP”

Isabella Santos Silva

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clarice Queico Fujimura Leite

ARARAQUARA – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CAMPUS DE ARARAQUARA

Trabalho de Conclusão de Curso

“Pesquisa de genes de resistência do *M. tuberculosis* a isoniazida e rifampicina por sequenciamento e pela tecnologia de DNA-STRIP”

Isabella Santos Silva

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clarice Queico Fujimura Leite

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

ARARAQUARA – SP

2013

## Dedicatória

Dedico este trabalho

À Deus,

Aos meus pais, Vera Lúcia e José Francisco, pela dedicação e amor incondicional,

À minha irmã, Gabriella e a todos da minha família por todo apoio.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus.

Aos meus pais, por todo suporte concedido, por serem meu exemplo e pelo o que sou e conquistei até agora, sem os quais nada seria possível.

À minha irmã, por ser minha conselheira, confidente e amiga.

À Prof<sup>a</sup> Clarice Queico por me conceder a oportunidade de realização de diferentes projetos de Iniciação Científica, acreditando no meu potencial e pelo seu exemplo de profissional dedicada e competente.

Aos admirados Adolfo Carlos Barreto Santos, Daisy Nakamura Sato, Fernando Rogério Pavan e Marcelo Miyata por todo ensinamento, paciência e exemplo como pesquisadores.

Aos meus amigos Heloisa Barbosa de Barros, Leonardo Biancolino Marino, Paula Carolina de Souza por todo apoio concedido e pela amizade criada no laboratório.

Aos meus amigos, Arthur Zanetti, Bárbara Kapp, Cindy Nishihara, Heloisa Barbosa de Barros, Ivy Ishino, Renata Afonso e Renata Kurokawa que estavam comigo em diversos momentos, sendo como uma família durante toda a graduação.

Ao PIBIC/CNPq, pelo financiamento do Projeto.

## Sumário

Resumo

Lista de ilustrações

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

1. Introdução.....	10
2. Objetivo.....	17
3. Metodologia.....	17
3.1 Isolados clínicos.....	17
3.2 Extração de DNA.....	18
3.3 GenoType <sup>®</sup> MTBDRplus.....	18
3.4 Sequenciamento genético.....	20
4. Resultados.....	22
4.1 Características dos isolados analisados.....	22
4.2 GenoType <sup>®</sup> MTBDRplus.....	23
4.3 Sequenciamento genético.....	23
5. Discussão.....	28
6. Conclusão.....	32
7. Referências Bibliográficas.....	33

## Resumo

Tuberculose (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis*, é uma das doenças infecciosas que mais causam mortes. Estima-se que mais de dois bilhões de pessoas estejam infectadas no mundo. O tratamento da TB consiste em associação de fármacos, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, nos primeiros 2 meses e 4 meses de isoniazida e de rifampicina. Internacionalmente, são consideradas cepas multi resistentes (MDR), as que apresentam resistência simultânea a isoniazida e a rifampicina. A rápida detecção de resistência é essencial para o controle e tratamento da TB, reduzindo, assim, o custo do tratamento e a transmissão da doença. Neste projeto, os isolados já identificados fenotipicamente como resistentes a isoniazida e/ou rifampicina, foram submetidos ao sequenciamento de Sanger para pesquisa de 3 genes relacionados a resistência a isoniazida (*katG*, *inhA* e *ahpC*) e 1 gene de resistência a rifampicina (*rpoB*). Foi realizada uma comparação destes genes mutados para a resistência utilizando o novo teste desenvolvido pela Biomérieux, denominado GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus, que se baseia na tecnologia DNA-STRIP. Através deste novo teste, foi observada mutação em 22 isolados clínicos de *M. tuberculosis* para genes de resistência a isoniazida e/ou rifampicina, sendo 4 provenientes do MS e 18 de SP. Já pelo sequenciamento genético foi observada mutação em 24 isolados para genes de resistência a isoniazida e/ou rifampicina, sendo 6 provenientes do MS e 18 de SP. Portanto, através do sequenciamento de Sanger, foi possível detectar um número maior de isolados mutados e mais mutações quando comparado ao teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus. Isso acontece porque na técnica de sequenciamento, um fragmento do gene como um todo é analisado e no caso do teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus, é verificada apenas a ausência ou presença das mutações mais frequentes descritas na literatura, além de não ser analisado o gene *ahpC*. A grande vantagem do teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus é a rapidez com que o resultado pode ser obtido, permitindo um diagnóstico rápido que ajuda no controle da TB resistente.

## **Lista de ilustrações**

Figura 1. Mecanismo de ação da isoniazida e aquisição de resistência (SANTOS, 2010) .....	13
Figura 2. Modelo da tira MTBDRplus <sup>®</sup> demonstrando a localização das sondas.....	15
Figura 3. Esquema do sequenciamento de Sanger.....	16

## **Lista de tabelas**

Tabela 1. Descrição dos parâmetros e da sequência dos iniciadores necessários para a amplificação dos genes estudados.....	20
Tabela 2. Características e resultados de BACTEC™ dos isolados analisados.....	22
Tabela 3. Resultados encontrados pelas duas metodologias.....	25
Tabela 4. Isolados que apresentaram diferenças nas mutações pelo teste GenoType® MTBDRplus quando comparado ao sequenciamento.....	29
Tabela 5. Quadro comparativo de resistência e sensibilidade.....	30



## Lista de abreviaturas e siglas

$\mu\text{L}$  - Microlitro

$\mu\text{M}$  - Micromolar

A - Adenina

AP - Fosfatase alcalina

BAAR - Bacilo Álcool Ácido Resistente

C - Citosina

C.F. - Clemente Ferreira

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético

ETB - Etambutol

G - Guanina

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

INH - Isoniazida

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública

L.J. - Löwestein-Jensen

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MDR - Multi Droga Resistente

MS - Mato Grosso do Sul

*M. tuberculosis* - *Mycobacterium tuberculosis*

ng - Nanograma

pb - Pares de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PZA - Pirazinamida

R - Resistente

RIF ou RMP - Rifampicina

RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro

S - Sensível

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SP - São Paulo

STR - Estreptomicina

T - Timina

TB - Tuberculose

TE - Tampão Tris-EDTA

WHO - *World Health Organization*

WT - Wild type

## 1. Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por um bacilo da espécie *Mycobacterium tuberculosis*. Ele geralmente afeta os pulmões (TB pulmonar), mas também pode afetar outros locais (TB extrapulmonar). A doença é transmitida através do ar quando as pessoas que estão doentes com TB pulmonar eliminam as bactérias, por exemplo, ao falar, tossir ou espirrar. Em geral, uma proporção relativamente pequena de pessoas infectadas com o *Mycobacterium tuberculosis* irão desenvolver a TB doença. (WHO, 2011).

Mais de dois bilhões de pessoas, o equivalente a um terço da população mundial, estão infectadas com o bacilo da tuberculose. E entre essas pessoas, uma em cada 10 irá desenvolver a doença (WHO, 2010).

No ano de 2010, foram notificados no Brasil cerca de 70 mil novos casos de TB e 4,8 mil mortes em decorrência da doença. A TB é a terceira causa de morte devido a um único agente infeccioso e para os pacientes co-infectados com AIDS, é a primeira causa de mortes (SVS, 2010). Neste contexto, o Brasil ocupa a incomoda 19<sup>o</sup> classificação dentre os 22 países com maior número de pacientes infectados (SVS, 2010). Esses 22 países respondem por 90% dos casos de TB em todo o mundo. Ainda, no mesmo ano, o Brasil ocupou o 108<sup>o</sup> lugar no ranking dos países com maior incidência de TB. Ainda em relação aos dados epidemiológicos nacionais, segundo O Ministério da Saúde – SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) o número de pessoas do sexo masculino infectados é superior ao do sexo feminino e a faixa etária mais acometida é dos 35 aos 64 anos. Nas questões de raça, no Brasil os indígenas ainda são os mais acometidos com aproximadamente 100 casos para cada 100.000 indígenas, seguido das raças amarela, negro-parda e branca respectivamente.

Tuberculose multidroga resistente (MDR-TB) é causada por micobactérias que são pelo menos resistentes à dois fármacos anti-tuberculose de primeira linha, rifampicina e isoniazida. Os métodos convencionais para a cultura de micobactérias e teste de sensibilidade

de drogas são lentos e laboriosos, exigindo procedimentos sequenciais para o diagnóstico. Durante este tempo, os pacientes podem ser tratados de forma inadequada, as cepas resistentes a fármacos podem continuar a espalhar-se, e amplificação de resistência pode ocorrer. Portanto, diagnóstico rápido e identificação de cepas MDR-TB são pré-requisitos para a luta mundial contra a TB.

A OMS estima que cerca de 450.000 pessoas contraíram a MDR –TB, um dos tipos de tuberculose resistente a drogas, em 2012, e outros acreditam que a epidemia da doença é ainda mais ampla, citando estudos regionais recentes que concluíram que os níveis de tuberculose, resistente ou não a medicamentos, estão muito acima do que acreditavam as autoridades inicialmente. Apenas uma parte desse total é diagnosticada: 94.000 novos casos de tuberculose resistente a medicamentos e multirresistente foram diagnosticados em 2012, acima dos 62.000 casos diagnosticados em 2011, informou a OMS. Desse novo total, 77.000 pacientes receberam tratamentos com antibióticos em 2012. Os outros cerca de 17.000 foram colocados em filas de espera. (MCKAY, 2013)

A epidemia pelo HIV favoreceu o aumento de novos casos de TB. Isso ocorreu porque a imunidade na TB é mediada pelo sistema imunológico celular, o qual está comprometido na infecção pelo HIV. Portanto, esta pandemia causa impacto no controle da TB e no aumento da frequência das formas graves, extrapulmonares e disseminadas na manifestação da SIDA (WILDNER, *et. al.*, 2011).

Em relação ao tratamento, com o advento de terapia à base de antibióticos nos anos 50, houve um declínio nos casos de tuberculose, mas no final dos anos 80, houve um ressurgimento da TB nos países desenvolvidos assim como nos países em desenvolvimento (BLOOM, 1992).

Anteriormente, o esquema de tratamento básico consistia na quimioterapia de curta duração durante seis meses, que incluía rifampicina (RMP), isoniazida (INH) e pirazinamida

(PZA) durante os primeiros dois meses na fase de tratamento intensivo, seguidos de RMP e INH durante os próximos quatro meses na fase de continuação. Atualmente, o PNCT/MS introduziu um quarto fármaco, o etambutol (ETB), na fase de ataque e adotou a associação dos fármacos em forma de comprimidos, com doses fixas combinadas 4 em 1 (INH, RMP, PZA e ETB) para a fase de tratamento intensivo, e 2 em 1 (RMP e INH) para a fase de continuação. Esse esquema básico é indicado para todos os casos novos de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar (exceto meningoencefalite), bem como para todos os casos de recidiva e retorno após abandono (CONDE *et al.* 2009).

O esquema de tratamento, no caso de falência do esquema básico, seja por resistência à RMP e INH ou RMP, INH e mais outro fármaco de primeira linha, ou pela impossibilidade de uso do esquema básico por intolerância a dois ou mais medicamentos, é composto por cinco medicamentos: (estreptomicina (STR), etambutol (ETB), ofloxacina, pirazinamida e terizidona) durante seis meses na fase intensiva e três medicamentos durante 12 meses na fase de manutenção (etambutol, ofloxacina e terizidona), totalizando uma duração de 18 meses (CONDE *et al.* 2009).

A isoniazida é uma pró-droga que necessita ser ativada pela enzima catalase/peroxidase (*katG*) do *M. tuberculosis*, consequentemente produzindo radicais reativos de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrato) e radicais orgânicos que inibem a formação de ácido micólico da parede celular, causando dano ao DNA e subsequente morte do bacilo. O mecanismo mais comum de resistência à isoniazida consiste em mutações na *katG*, que diminuem sua atividade, impedindo a conversão do pró-fármaco em seu metabólito ativo (ARBEX, 2010).

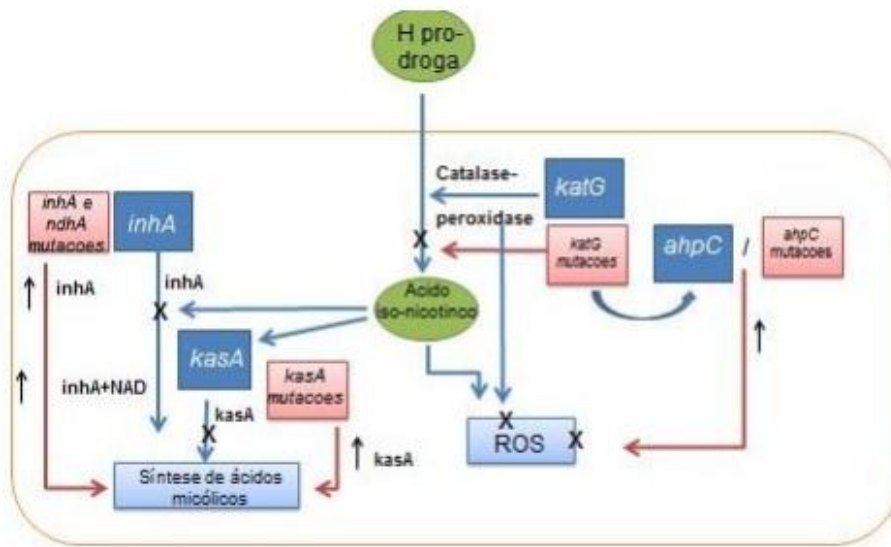


Figura 1. Mecanismo de ação da isoniazida e aquisição de resistência (SANTOS, 2010).

A rifampicina inibe a transcrição gênica da micobactéria por bloqueio da RNA polimerase DNA dependente, o que impede a síntese de RNA mensageiro (RNAm) e de proteína pelo bacilo, produzindo morte celular. A resistência à rifampicina ocorre devido à mutação do gene *rpoB*, que codifica a cadeia beta da RNA polimerase (ARBEX, 2010).

O teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus (Hain Lifescience) é baseado na tecnologia DNA-STRIP e permite a identificação molecular do complexo *M. tuberculosis* e da resistência à rifampicina e/ou isoniazida a partir de amostras cultivadas ou amostras clínicas pulmonares com microscopia positiva. A identificação da resistência à rifampicina é facultada pela detecção das mutações mais significativas do gene *rpoB* (que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase). Para testar o nível elevado de resistência à isoniazida é examinado o gene *katG* (que codifica a catalase peroxidase), e para testar o nível baixo de resistência à isoniazida é examinada a região promotora do gene *inhA* (que codifica o NADH-enoil-ACP-redutase) (HAIN LIFESCIENCE, 2012). Sendo assim, este método molecular permite fazer o diagnóstico rápido e detecta as mutações mais comuns nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA*.

Cada tira do teste MTBDRplus<sup>®</sup> contém 27 sondas, incluindo 6 controles de amplificação e hibridização (controle do conjugado - CC, controle de amplificação - AC, complexo *M. tuberculosis* - TUB, *rpoB*, *katG* e *inhA*) que permitem verificar se o ensaio correu de forma adequada. Para a detecção da resistência à rifampicina, existem oito sondas do tipo selvagem (WT – wild type) que abrangem a região 504-533 do gene *rpoB* e quatro sondas para as mutações mais comuns associadas ao fenótipo resistente, sendo elas: MUT1 (mutação no códon 516, levando a alteração do aminoácido traduzido de aspartato para valina - D516V), MUT2A (mutação no códon 526, levando a alteração do aminoácido traduzido de histidina para tirosina - H526Y), MUT2B (mutação no códon 526, levando a alteração do aminoácido traduzido de histidina para aspartato - H526D), e MUT3 (mutação no códon 531, levando a alteração do aminoácido traduzido de serina para leucina - S531L). Para a detecção da resistência à isoniazida, analisaram-se os genes *katG* e *inhA*. Para o gene *katG* existe uma sonda do tipo selvagem para a região 315 que codifica uma serina (AGC) e as sondas MUT T1 (ACC) e MUT T2 (ACA) para as mutações S315T, ou seja, através da mudança do nucleotídeo devido as mutações há a mudança do código genético, havendo a tradução de uma treonina ao invés da serina. A região promotora do gene *inhA* compreende as regiões entre as posições -9 a -22 para a sonda do tipo selvagem 1 (WT1) e as posições -1 a -12 para a sonda do tipo selvagem 2 (WT2). As sondas MUT1, MUT2, MUT3A e MUT3B permitem avaliar quatro mutações no gene *inhA*. As resistências à isoniazida e à rifampicina são detectadas, por ausência de sinal numa sonda do tipo selvagem (WT) e/ou no aparecimento de sinal numa sonda mutante (SUTRE, 2010). O modelo da tira do teste MTBDRplus<sup>®</sup> é demonstrado na Figura 2.

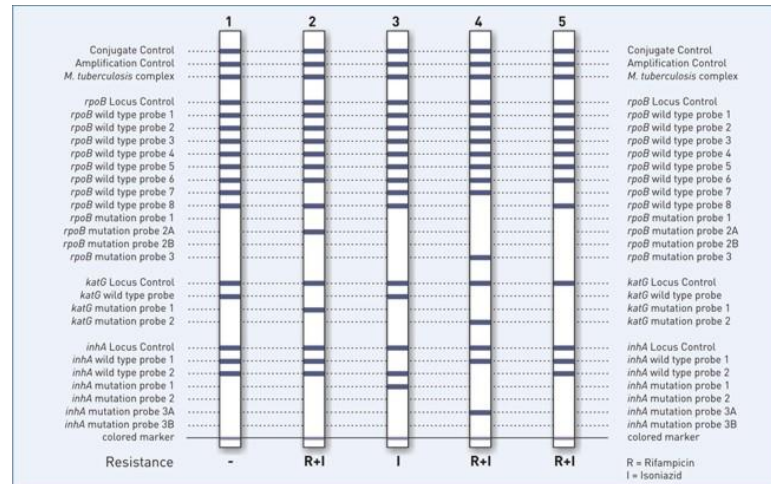


Figura 2. Modelo da tira MTBDRplus® demonstrando a localização das sondas.

O sequenciamento de produtos de PCR (*amplicons*) é a principal técnica usada para elucidar os mecanismos de resistência aos fármacos em *M. tuberculosis*. Este é um método direto que permite detectar mutações já conhecidas e identificar novas mutações.

O sequenciamento de Sanger é realizado usando sequenciadores automáticos que são altamente reprodutíveis. Nesta técnica, a região alvo é amplificada via PCR usando iniciadores apropriados e nucleotídeos padrões. O produto de amplificação é desnaturado e submetido à uma nova amplificação, onde os iniciadores 3' e 5' são usados separadamente. Os fragmentos marcados com um fluorocromo específico para o nucleotídeo com o qual termina a cadeia são gerados pela amplificação assimétrica e são colocados por ordem de tamanho por meio de eletroforese. Os padrões dos marcadores fluorescentes são identificados pelas últimas bases de uma série contínua de elongação, cada série com um nucleotídeo maior do que o anterior, o que possibilita determinar a sequência genética da região. É importante realizar o sequenciamento das cadeias 3' e 5' para cuidadosamente resolver as discrepâncias (PALOMINO et al. 2007). Um esquema do sequenciamento de Sanger é demonstrado abaixo:



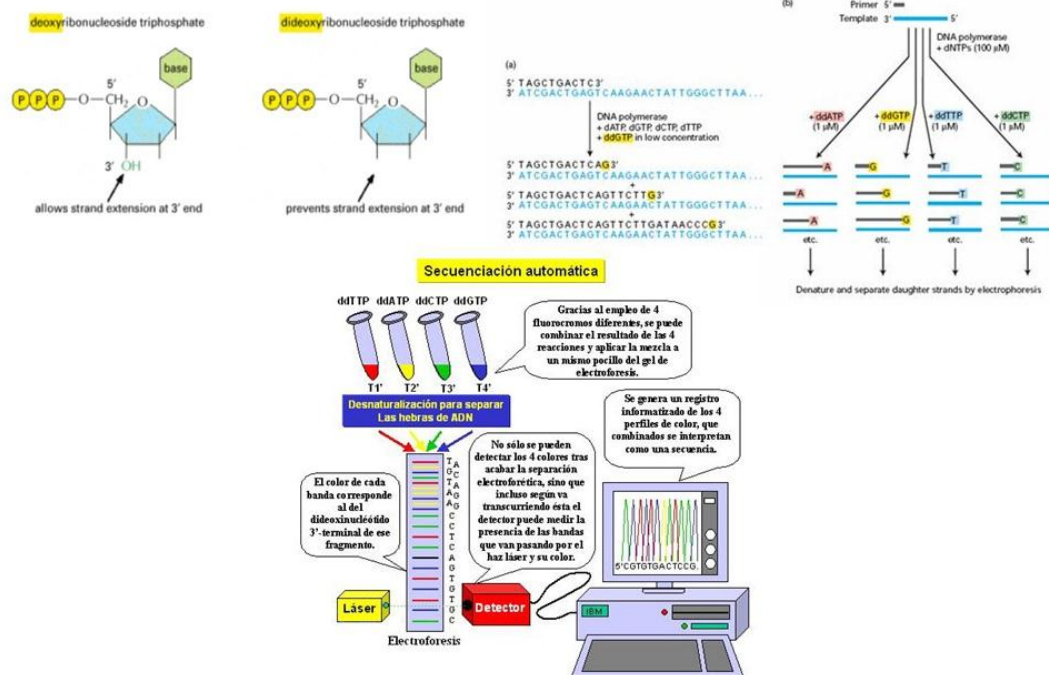


Figura 3. Esquema do sequenciamento de Sanger.

A partir da análise de regiões do DNA de isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH, diversos pesquisadores têm relatado a ocorrência de mutações associadas a esse tipo de resistência, sendo que as mutações nos genes *katG* e *inhA* são encontradas em 75-85% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes a esse fármaco. Essas mutações frequentemente estão associadas à perda da atividade de catalase peroxidase. Essa enzima é responsável também pela ativação da INH endogenamente. A enzima *inhA* (enoil-ACP redutase), que catalisa uma etapa primária na síntese de ácido graxo, quando alterada em consequência da mutação no gene, modifica sua afinidade pelo cofator, resultando na expressão de um fenótipo resistente à INH (ROSSETTI, 2002).

As mutações podem ocorrer na região codificante ou no promotor do gene *inhA* (RAMASWAMY *et al.* 2003), causando super-expressão de *InhA*, ou por mutações no sítio ativo de *InhA*, diminuindo a afinidade de *InhA* à INH-NAD adulta (ROZWARSKI *et al.* 1998; BANERJEE *et al.* 1994).

As mutações em *ahpC* foram identificadas em isolados clínicos desse microrganismo e estão localizadas em importantes regiões promotoras do gene (ROSSETTI, 2002).

A resistência à rifampicina é pouco comum, porém tem aumentado ultimamente, alertando para o desenvolvimento de linhagens MDR. Dificilmente a resistência à RMP ocorre isolada. Na maioria dos casos, está associada a outros fármacos, principalmente ao INH. Nesse contexto, a resistência à RMP pode ser assumida como um marcador para a TB MDR. A caracterização do gene *rpoB* em *Escherichia coli* demonstrou que a rifampicina interage especificamente com a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase e que mutações no locus *rpoB* conferem trocas conformacionais, impedindo uma ligação eficiente do fármaco e, conseqüentemente, a resistência. Essas informações auxiliaram na compreensão das bases de resistência à RMP em *M. tuberculosis* (ROSSETTI, 2002).

## **2. Objetivo**

Determinar as mutações em isolados resistentes a isoniazida e rifampicina provenientes de São Paulo (SP) e do Mato Grosso do Sul (MS) através de sequenciamento genético e do teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus, baseado na tecnologia DNA-STRIP.

## **3. Metodologia**

### **3.1 Isolados clínicos**

Foram selecionados 36 isolados clínicos de *M. tuberculosis*. Dezoito (18) isolados de São Paulo, provenientes de pacientes atendidos no Instituto Clemente Ferreira, localizado na cidade de São Paulo e outros dezoito (18) isolados do Mato Grosso do Sul, provenientes do Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul, localizado em Campo Grande. Estes isolados foram confirmados como de *M. tuberculosis* através da baciloscopia

de Ziehl-Nielsen, isolamento em meio LJ e identificação clássica pelo laboratório de origem. O perfil de susceptibilidade dos isolados frente aos fármacos do esquema terapêutico foi determinado pelo laboratório de origem ou pelo Laboratório de Micobacteriologia Dr. Hugo David empregando o sistema BACTEC™ MGIT™ 960.

### 3.2 Extração de DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada através da termólise da seguinte maneira, a micobactéria foi acrescida em tampão TE e submetida a três ciclos de fervura (100°C) por 10 minutos e congelamento a -20°C por 20 minutos. DNA extraído por termólise foi amplificado através da PCR, segundo van EMBDEN *et al.* (1993).

### 3.3 GenoType® MTBDRplus

O procedimento é dividido em três passos: extração de DNA das amostras; amplificação por PCR multiplex com conjuntos de primers biotinilados e uma hibridização reversa. A hibridização reversa envolve a desnaturação química dos produtos de amplificação, hibridização dos *amplicons* (em cadeia simples e marcados com biotina) à sondas ligadas à membrana, lavagem adstringente, adição de um conjugado de estreptavidina/fosfatase alcalina (AP), e uma reação com produção de cor mediada pela fosfatase alcalina (HAIN LIFESCIENCE, 2012).

A extração do DNA bacteriano foi realizada através da termólise da seguinte maneira, a micobactéria foi acrescida em tampão TE e submetida a três ciclos de fervura (100°C) por 10 minutos e congelamento a -20°C por 20 minutos. A amplificação foi realizada com 35 µL de PNM (primer/nucleotide mixture), 5 µL de tampão de PCR, 2 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µL de Taq DNA polimerase, 3 µL água Milli-Q para completar o volume para 45 µL e por final, 5 µL da solução de DNA, levando a um volume final de 50 µL.

O programa de amplificação consiste em 1 ciclo de 15 minutos a 95°C; 10 ciclos de 30 segundos a 95°C e 2 minutos a 58°C; 20 ciclos de 25 segundos a 95°C, 40 segundos a 53°C, 40 segundos a 70°C; e 1 ciclo de 8 minutos a 70°C para amostras de cultura. Já para amostras clínicas, são necessários 30 ciclos na terceira parte, ao invés de 20 ciclos.

A hibridização foi realizada da seguinte forma, foi dispensado 20 µL da Solução de Desnaturação num canto de cada poço, em seguida, foram adicionados 20 µL da amostra amplificada e tudo foi homogeneizado, sendo incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período, foi adicionado 1 mL de Tampão de Hibridização pré-aquecido (37-45°C), então foram colocadas cada tira em um poço. Essa mistura foi incubada no TwinCubator (Hain Lifescience) durante 30 minutos a 45°C.

Passado este período, todo o conteúdo foi aspirado e descartado. Adicionou-se 1 mL de Solução de Lavagem Adstringente a cada tira e incubado durante 15 minutos a 45°C. A solução foi removida completamente, então cada tira foi lavada uma vez com 1 mL de Solução de *Rinse* durante 1 minuto na plataforma de agitação, após a remoção desta solução foi adicionado 1 mL do conjugado diluído [10 µL do conjugado concentrado (CON-C) + 990 µL do tampão do conjugado (CON-D)] e incubado durante 30 minutos na plataforma de agitação.

A solução foi retirada e a tira lavada duas vezes, durante 1 minuto, com 1 mL de Solução de *Rinse* e uma vez, durante 1 minuto, com aproximadamente 1 mL de água destilada numa plataforma de agitação. Então, foi adicionado 1 mL de substrato diluído [10µL do substrato concentrado (SUB-C) + 990µL do tampão do substrato (SUB-D)] e incubado de 2-10 minutos a temperatura ambiente sem agitação. A reação foi interrompida através da lavagem com água destilada por 1 minuto duas vezes. Com o auxílio de uma pinça, as tiras foram retiradas e então, secas entre duas camadas de papel absorvente. Depois de secas, estas foram coladas na folha de trabalho para serem devidamente analisadas.

### 3.4 Sequenciamento genético

O sequenciamento dos genes dos isolados clínicos selecionados, consistiu na amplificação dos genes *inhA*, *katG*, *ahpC*, *rpoB* com os seguintes iniciadores:

Tabela 1. Descrição dos parâmetros e da sequência dos iniciadores necessários para a amplificação dos genes estudados.

Gene	Sequência	Temperatura de hibridização	Tamanho do fragmento
<i>inhA</i>	5'-GCTGAGTCACACCGACAAACG-3'	58°C	187 pb
	5'-CCAGGACTGAACGGGATACGA-3'	58°C	
<i>katG</i>	5'-AGAGCTCGTATGGCACCGGA-3'	58°C	145 pb
	5'-CCAGCAGGGCTCTTCGTCAG-3'	58°C	
<i>ahpC</i>	5'-CTTGCGGCACTGCTGAACCAC-3'	60°C	264 pb
	5'-ACAGGTCACCGCCGATGAGAG-3'	60°C	
<i>rpoB</i>	5'-GTCGGCGAGCTGATCCAAAAC-3'	62°C	409 pb
	5'-GGTACGGCGTTTCGATGAACC-3'	58°C	

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação. Os produtos da PCR foram purificados utilizando as enzimas ExoSAP-IT (USB, Cleveland, USA) com uma incubação de 15 min a 37°C para a ação enzimática, seguido de uma incubação de 15 min a 80°C para a inativação enzimática. Em seguida, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Os produtos purificados foram ajustados para a concentração de 20 ng/μL, e os iniciadores, foram ajustados para a concentração de 5 μM.

O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo, utilizando o sistema de sequenciamento de DNA MEGABACE™ 1000 de 96 amostras (GE Healthcare Life Sciences, Brasil). As

reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* que contém a *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase* (GE Healthcare Life Sciences, Brasil) seguindo as instruções do fabricante.

Para cada reação, foram utilizados 5 µL do produto de PCR purificado e 2,5 µL de cada iniciador por reação para o sequenciamento das fitas *sense* e *antisense*. Os resultados do sequenciamento foram analisados pelo software Sequencher™, versão 4.10.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA), que comparou as sequências obtidas dos isolados clínicos com a cepa padrão *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. O software Gene Runner (Hastings Software, Colorado, USA) foi utilizado para a determinação da posição da mutação no gene ou no promotor do gene e o códon correspondente à mudança.

O sistema de sequenciamento de DNA MEGABACE™ 1000 é um sequenciador de DNA de alto rendimento baseado em fluorescência que utiliza eletroforese capilar. O kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* utilizado baseia-se no método de sequenciamento de Sanger, *et al.* um método enzimático de término de cadeia. O crescimento enzimático da fita complementar é interrompido pela adição de um dideoxynucleotídeo. Cada dideoxynucleotídeo é ligado a um fluoróforos diferente, emitindo energia em diferentes comprimentos de onda. Sendo assim, após a reação passar pelo capilar e separar os diversos fragmentos gerados, através da leitura pelo detector e da transferência de sinal para o computador, será possível identificar qual a sequência de nucleotídeo no fragmento analisado.



CF 174	SP							R	R
--------	----	--	--	--	--	--	--	---	---

R – Resistente / S – sensível

#### 4.2 GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus

Foram analisadas 36 amostras, sendo 18 provenientes de pacientes do Mato Grosso do Sul e 18 provenientes de pacientes de São Paulo. Dentre essas, foram detectadas através desta metodologia, 22 cepas resistentes a isoniazida e/ou rifampicina, sendo 4 do MS e 18 de SP.

Foi observada a mutação em 22 isolados para genes de resistência a isoniazida e/ou rifampicina, sendo 4 provenientes do MS e 18 de SP. Os 4 isolados provenientes do MS apresentam mutações nos genes *rpoB* e *katG*, demonstrando que estes são resistentes à rifampicina e isoniazida, ou seja, estes são multi droga resistentes (MDR). Já os isolados provenientes de SP, 11 apresentam mutações nos genes *rpoB* e *katG*, e 4 apresentaram mutações nos genes *rpoB* e no promotor do gene *inhA*, demonstrando que estes 15 isolados são resistentes à rifampicina e isoniazida (MDR). Houveram também, 3 isolados de SP que apresentaram mutação apenas no gene *rpoB*, demonstrando assim apenas resistência a rifampicina.

#### 4.3 Sequenciamento genético

Os mesmos 36 isolados clínicos analisados pela técnica GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus foram analisados por sequenciamento genético.

Foi observada a mutação em 24 isolados para genes de resistência a isoniazida e/ou rifampicina, sendo 6 provenientes do MS e 18 de SP. Dos 6 isolados provenientes do MS, 3 apresentaram mutações nos genes *rpoB* e *katG*, e 1 apresentou mutação para *rpoB*, *katG* e *ahpC*, demonstrando que estes são resistentes à rifampicina e isoniazida, ou seja, estes são multi droga resistentes (MDR). Dos outros 2 do MS, 1 apresentou mutação para o gene *ahpC* e o outro para *katG*, demonstrando resistência a isoniazida. Já os isolados provenientes de SP,



11 apresentaram mutações nos genes *rpoB* e *katG*, 2 apresentaram mutações nos genes *rpoB* e promotor do gene *inhA*, 1 apresentou mutações nos genes *rpoB*, promotor do *inhA* e *ahpC* e outro apresentou mutações nos genes *rpoB*, promotor do *inhA* e *katG* demonstrando que estes 15 isolados são resistentes à rifampicina e isoniazida (MDR). Houveram também, 2 isolados de SP que apresentaram mutação apenas no gene *rpoB*, demonstrando assim apenas resistência a rifampicina e 1 outro isolado que apresentou mutação apenas no promotor do *inhA*, demonstrando resistência apenas a isoniazida.

Para o promotor do *inhA*, todas as mutações ocorreram no nucleotídeo -15, onde houve a troca de citosina por timina. Para o gene *katG*, 88,24% das mutações ocorreram no códon 315, havendo a troca de guanina por citosina, levando a alteração de serina para treonina. Para o gene *ahpC*, todas as mutações encontradas diferenciaram uma da outra. Já para o gene *rpoB*, 61,9% das mutações ocorreram nos códons 450 e 531, havendo troca de citosina por timina, mas não havendo alteração no aminoácido.

As mutações encontradas pelas duas metodologias estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 3. Resultados encontrados pelas duas metodologias.

N°	UF	Teste	<i>inhA</i>		<i>katG</i>			<i>ahpC</i>		<i>rpoB</i>		
03/1407	MS	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			G > T	códon 516	Asp516Tyr
03/1407	MS	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT3,4		Asp516Tyr ou deleção 515
04/224	MS	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			T > C	códon 505	Phe505Leu
04/224	MS	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT1 / 3,4		Phe505Leu ou Thr508Ala ou Ser509Thr / Asp516Tyr ou deleção 515
03/416	MS	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr	C > T	nucle -72	C > T	códon 531	Ser531Leu
03/416	MS	GenoType® MTBDRplus								ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
05/72	MS	Sequenciamento						T > A	nucle -89			
05/72	MS	GenoType® MTBDRplus						-	-			
03/147	MS	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			G > T	códon 516	Asp516Tyr
03/147	MS	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT3,4		Asp516Tyr ou deleção 515
03/741	MS	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr					
03/741	MS	GenoType® MTBDRplus						-	-			
CF 55	SP	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			C > T	códon 450/531	Sem alteração
CF 55	SP	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
CF 61	SP	Sequenciamento	C > T	nucle -15				C > T	nucle -81	C > T	códon 450/531	Sem alteração
CF 61	SP	GenoType® MTBDRplus	ausência WT1 / presença MUT1	nucle -15				-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
CF 74	SP	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			C > G e A > C / A > C	códon 445,446/526,527	Pro > Ala / Gln > Pro
CF 74	SP	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT7		His526Arg ou His526Pro* ou His526Gln* ou His526Asn ou His526Leu ou His526Ser ou His526Cys
CF 80	SP	Sequenciamento	C > T	nucle -15						C > T	códon 450/531	Sem alteração

CF 80	SP	GenoType® MTBDRplus	ausência WT1 / presença MUT1	nucle -15				-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
CF 81	SP	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			A > T	códon 435/516	Sem alteração
CF 81	SP	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT3,4	presença MUT1	Asp516Val
CF 92	SP	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			C > T	códon 450/531	Sem alteração
CF 92	SP	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
CF 104	SP	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			C > T	códon 450/531	Sem alteração
CF 104	SP	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
CF 105	SP	Sequenciamento								C > T	códon 450/531	Sem alteração
CF 105	SP	GenoType® MTBDRplus						-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
CF 108	SP	Sequenciamento								C > T	códon 450/531	Sem alteração
CF 108	SP	GenoType® MTBDRplus						-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
CF 114	SP	Sequenciamento	C > T	nucle -15								
CF 114	SP	GenoType® MTBDRplus	ausência WT1 / presença MUT1	nucle -15				-	-			
CF 138	SP	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			C > T	códon 450/531	Sem alteração
CF 138	SP	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
CF 142	SP	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			C > T	códon 450/531	Sem alteração
CF 142	SP	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
CF 152	SP	Sequenciamento	C > T	nucle -15						C > T	códon 450/531	Sem alteração
CF 152	SP	GenoType® MTBDRplus	ausência WT1 / presença MUT1	nucle -15				-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
CF 161	SP	Sequenciamento	C > T	nucle -15	T > A	códon 337	Tyr337Asn			C > T	códon 450/531	Sem alteração
CF 161	SP	GenoType® MTBDRplus	ausência WT1 / presença MUT1	nucle -15				-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
CF 162	SP	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			C > T	códon 450/531	Sem alteração
CF 162	SP	GenoType®			ausência	presença	Ser315Thr	-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu

		MTBDRplus			WT	MUT1						
<b>CF 163</b>	SP	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			C > T	códon 445/526	Pro > Leu
<b>CF 163</b>	SP	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT7	presença MUT2A	His526Tyr
<b>CF 173</b>	SP	Sequenciamento			T > A	códon 337	Tyr337Asn			C > T	códon 450/531	Sem alteração
<b>CF 173</b>	SP	GenoType® MTBDRplus						-	-	ausência WT8	presença MUT3	Ser531Leu
<b>CF 174</b>	SP	Sequenciamento			G > C	códon 315	Ser315Thr			C > T	códon 445/526	Pro > Leu
<b>CF 174</b>	SP	GenoType® MTBDRplus			ausência WT	presença MUT1	Ser315Thr	-	-	ausência WT7	presença MUT2A	His526Tyr

## 5. Discussão

Através do teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus foi possível detectar um número de isolados resistentes muito parecido quando comparado com o sequenciamento genético. Considerando as mutações apenas em números, houve diferença de apenas 2 isolados provenientes do Mato Grosso do Sul, que no sequenciamento genético foram detectadas mutações e no teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus não. O isolado 05/72 não foi considerado como mutado pelo teste, pois sua mutação, demonstrada pelo sequenciamento, ocorreu no gene *ahpC* que não é contemplado no teste. Porém, não foi o que impediu a detecção da mutação do isolado 03/741, isso porque a mutação encontrada pelo sequenciamento foi no gene *katG*, onde houve a troca de guanina por citosina no códon 315, mutação contemplada pelo teste baseado na tecnologia DNA-STRIP, mas que não foi identificada pelo mesmo.

Comparando separadamente cada isolado pode-se observar que os isolados 03/1407, 04/224, 03/147 e CF114 demonstraram a mesma mutação pelas duas técnicas realizadas. Já para o isolado 03/416 não foi detectada a mutação no gene *katG* e no *ahpC* pelo teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus, o caso do gene *ahpC* é devido a não contemplação deste na tira.

Nos isolados CF55, CF80, CF81, CF92, CF104, CF105, CF108, CF138, CF142, CF152 e CF162 a única diferença ocorreu em um aminoácido codificado pelo códon do gene *rpoB*, pois pelo sequenciamento foi demonstrado que não houve alteração de aminoácido, ou seja, ocorreu uma mutação silenciosa, mas pelo teste houve essa alteração e isto implica na resistência ou sensibilidade do isolado. Nos isolados CF161 e CF173 ocorreu o mesmo, mas também não foi detectada a mutação no gene *katG*, isso aconteceu pois o códon mutado não é contemplado na tira do teste.

Com o isolado CF61 também houve a diferença no gene *rpoB*, mas além desta houve diferença por este haver mutação no gene *ahpC*.

No isolado CF74, a diferença ocorreu no gene *rpoB*, que pelo sequenciamento foi possível detectar várias mutações e no teste apenas uma. Nos isolados CF163 e CF174 a diferença foi similar, pois pelo sequenciamento foram detectadas duas mutações e no teste uma, e nesta o aminoácido trocado mostrou-se diferente.

Segue tabela com as diferenças encontradas:

Tabela 4. Isolados que apresentaram diferenças nas mutações pelo teste GenoType® MTBDRplus quando comparado ao sequenciamento.

	<i>inhA</i>	<i>katG</i>	<i>ahpC</i>	<i>rpoB</i>
03/1407				
04/224				
03/416		x	X	
05/72			X	
03/147				
03/741		x		
CF 55				x
CF 61			X	x
CF 74				x
CF 80				x
CF 81				x
CF 92				x
CF 104				x
CF 105				x
CF 108				x
CF 114				
CF 138				x
CF 142				x
CF 152				x
CF 161		x		x
CF 162				x

CF 163				x
CF 173		x		x
CF 174				x

Segue abaixo a tabela com os resultados de resistência ou sensibilidade dos isolados através do sequenciamento genético, do teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus e do BACTEC:

Tabela 5. Quadro comparativo de resistência e sensibilidade.

	BACTEC		Sequenciamento		GenoType <sup>®</sup> MTBDRplus	
	INH	RIF	INH	RIF	INH	RIF
03/1407	R	S	R	R	R	R
04/224	R	R	R	R	R	R
03/416	R	R	R	R	S	R
05/72	R	R	R	S	S	S
03/147	R	S	R	R	R	R
03/741	R	S	R	S	S	S
CF 55	R	R	R	S	R	R
CF 61	R	R	R	S	R	R
CF 74	R	R	R	R	R	R
CF 80	R	R	R	S	R	R
CF 81	R	R	R	S	R	R
CF 92	R	R	R	S	R	R
CF 104	R	R	R	S	R	R
CF 105	R	R	S	S	S	R
CF 108	R	R	S	S	S	R
CF 114	R	R	R	S	R	S
CF 138	R	R	R	S	R	R
CF 142	R	R	R	S	R	R
CF 152	R	R	R	S	R	R
CF 161	R	R	R	S	R	R
CF 162	R	R	R	S	R	R

CF 163	R	R	R	R	R	R
CF 173	R	R	R	S	R	S
CF 174	R	R	R	R	R	R

R – Resistente / S – sensível

A maioria dos isolados provenientes de São Paulo foram classificados como sensíveis a rifampicina pelo sequenciamento genético, isso ocorreu porque na grande maioria deles a mutação que ocorreu foi a mutação do tipo silenciosa, ou seja, há mutação, mas o aminoácido codificado é o mesmo, então, não vai gerar um isolado resistente, pois a proteína será produzida da forma original, não havendo problemas em sua conformação e, portanto, em sua função. Este caso fez com que houvesse uma grande diferença quando os métodos são comparados. Porém, o teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus detectou que havia uma mutação naquele gene, assim como o sequenciamento genético, portanto, levando isso em consideração, as diferenças foram pequenas.

Segundo Zhang, *et al.*, a mutação S315T no gene *katG* é a mutação mais comum em cepas resistentes à INH, representando 50-95% dos isolados clínicos resistentes à INH. Através do sequenciamento, foram detectados 18 isolados com mutação no gene *katG* e destes, 16 apresentam a mutação S315T, ou seja, 88,89% o que condiz com o estudo supracitado. Neste mesmo estudo é informado que para o gene *rpoB*, as mutações nas posições 531, 526 e 516 estão entre as mutações mais frequentes em linhagens resistentes à RIF, e nos isolados analisados pode-se observar esse mesmo padrão.

Comparando os resultados obtidos pelo teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus com o estudo de Huyen, *et al.* realizado com isolados provenientes do Vietnã podemos observar resultados semelhantes.

No estudo do Vietnã, dos isolados que exibiram mutações pelo teste, 75,3% tinham mutações ou nenhuma reação em sondas de tipo selvagem (WT) em *katG315*, incluindo



97,7% com mutação S315T1 (presença de MUT1). Dos isolados que exibiram mutação, 28,2% tinham mutações na região promotora do gene *inhA*, incluindo 95,3% com a presença de MUT1. E apenas 3,5% das cepas com uma mutação no códon 315 do gene *katG* tinham uma mutação adicional na região promotora do gene *inhA*.

No presente estudo, dos 22 isolados que foram classificados como mutados pelo teste, 13 (59,1%) tinham mutação no códon 315 do gene *katG*, sendo 100% com mutação S315T1. Para o gene *inhA*, 5 (22,7%) apresentaram mutação, sendo 100% com a presença de MUT1. E nenhum dos isolados apresentaram mutação em *katG* e *inhA* simultaneamente.

Algo que contribuiu para a diferença numérica de mutações foi o sequenciamento do gene *ahpC* que não é contemplado no teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus, além do sequenciamento ser de um fragmento do gene e no teste analisar apenas a presença das mutações mais encontradas nas cepas de *M. tuberculosis*. As diferenças são pequenas, e levando em consideração o tempo necessário para preparo de amostra, realização do teste e análise dos resultados, essas diferenças ficam ainda menores. O teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus é muito interessante devido a obtenção de resultados em um curto espaço de tempo que auxiliam no diagnóstico e, então, no controle da TB.

## 6. Conclusão

O teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus é uma tecnologia que detecta resistência através do genótipo, e sua grande vantagem é a rapidez com que o resultado pode ser obtido (cerca de oito horas), permitindo um diagnóstico rápido que ajuda no controle da TB resistente, sendo um ótimo instrumento para a triagem inicial de casos de tuberculose.

Através do sequenciamento genético foi possível detectar um número maior de isolados mutados e mais mutações quando comparado ao teste GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus. Isso acontece porque é sequenciado o fragmento do gene como um todo e no caso do teste

GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus, é verificada apenas a ausência ou presença das mutações mais frequentes descritas na literatura e o gene *ahpC* não é analisado.

## 7. Referências Bibliográficas

- ARBEX, M.A.; VARELLA, M.C.L.; SIQUEIRA, H.R.; MELLO, F.A.F. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. **J Bras Pneumol.**, v. 36, n. 5, p.626-640, 2010.
  
- BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; ALASUBRAMANIAN, V.; UM, K.S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; DE LISLE, G.; JACOBS, W.R. Jr. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 263, n. 5144, p. 227-230, 1994.
  
- BLOOM, B.R. Back to a frightening future. **Nature**, v.358, p.538-539, 1992.
  
- CONDE, M.B.; SOUZA, G.M.; KRITSKI, A.L. Tuberculose sem medo. São Paulo: Atheneu, 2002.
  
- HAIN LIFESCIENCE. **GenoType MTBDRplus: Instructions for Use**. Nehren, 2012.
  
- HUYEN, M.N.T.; COBELENS, F.G.J.; BUU, T.N.; LAN, N.T.N.; DUNG, N.H.; KREMER, K.; TIEMERSMA, E.W.; VAN SOOLINGEN, D. Epidemiology of Isoniazid Resistance Mutations and Their Effect on Tuberculosis Treatment Outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3620–3627, august 2013.

- MCKAY, BETSY. Tuberculose resistente a medicamentos se torna crise de saúde pública.

**The Wall Street Journal**, 2013. Disponível em:

<http://online.wsj.com/article/SB10001424052702304799404579154083363950184.html>.

Acesso em: 15-12-13.

- MIYATA, Marcelo. Construção de um painel com isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* com genes de resistência a quimioterápicos, para o estudo de novas drogas anti-TB. Araraquara: UNESP, 2010. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia): Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2010.

- PALOMINO, J.C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. Tuberculosis: from basic science to patient care. Belgium, Brazil and Argentina, 687 p. 2007.

- RAMASWAMY, S.V.; REICH, R.; DOU, S.J. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemoter**, v. 47, p. 1241-50, 2003.

- ROSSETTI, M.L.R.; VALIM, A.R.M.; SILVA, M.S.N.; RODRIGUES, V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Rev Saúde Pública**, v. 36, n. 4, p. 525-32, 2002.

- ROZWARSKI, D.A.; GRANT, G.A.; BARTON, D.H. *et al.* Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 279, p. 98–102, 1998.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, dezembro 1977.
  
- SANTOS, Lorena Cristina. Análise de resistência a antimicrobianos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas no estado de Goiás. 2010. 61 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública): Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
  
- Serviço de Vigilância em Saúde (SVS) – Ministério da saúde 2010. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa\\_incidencia\\_tb\\_1990\\_2010\\_atual\\_31\\_05\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa_incidencia_tb_1990_2010_atual_31_05_11.pdf). Acesso em: 03-12.
  
- SUTRE, A.F.M.A. Estudo molecular da resistência à rifampicina do complexo *Mycobacterium tuberculosis* numa população da Guiné-Bissau. 2010. 47 f. Tese (Mestrado em Microbiologia Aplicada): Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa. 2010.
  
- WHO - World Health Organization. 10 facts about tuberculosis. November 2010. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/tuberculosis/en/>. Acesso em: 15-03-12.
  
- WHO - World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO report, 2011. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564380\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564380_eng.pdf). Acesso em: 06-02-13.
  
- WILDNER, L.M.; NOGUEIRA, C.L.; SOUZA, B.S.; SENNA, S.G.; DA SILVA, R.M.; BAZZO, M.L. Micobactérias: Epidemiologia e Diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 3, p. 207-229, jul.-set. 2011.

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

**Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 13, n. 11, p. 1320–1330, 2009.

Araraquara, 13 de janeiro de 2014.

De acordo,



Isabella Santos Silva

---

Aluna: Isabella Santos Silva



---

Orientadora: Prof.ª. Dr.ª. Clarice Queico Fujimura Leite