



UNIVERSIDADE
DO BRASIL
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA GENEXPERT MTB/RIF® NO
DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE RESISTENTE À RIFAMPICINA.

THATIANA ALFENA DE SOUZA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
POLO UNIVERSITÁRIO DE DUQUE DE CAXIAS

2018



UNIVERSIDADE
DO BRASIL
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA GENEXPERT MTB/RIF® NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE RESISTENTE À RIFAMPICINA.

THATIANA ALFENA DE SOUZA

Monografia apresentada como atividade obrigatória à integralização de créditos para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - Modalidade EAD.
Orientador: M.Sc. Bianca Porphírio da Costa.

ORIENTADOR: M.Sc. BIANCA PORPHÍRIO DA COSTA.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
POLO UNIVERSITÁRIO DE DUQUE DE CAXIAS

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

SOUZA, Thatiana Alfena de

Utilização da metodologia GeneXpert MTB/RIF® no diagnóstico da Tuberculose Resistente à Rifampicina. Polo Duque de Caxias, 2018. 35 f. il: 31 cm.

Orientador: M.Sc. Bianca Porphírio da Costa.

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciado (a) no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD. 2018.

Referências: f.31-35

1. Palavras Chaves: *Mycobacterium tuberculosis*, Resistência, Multidroga Resistente (MDR), Teste de Sensibilidade (TS), GeneXpert MTB/RIF®, Teste Rápido Molecular (TRM), Rifampicina.

I. COSTA, Bianca Porphírio da

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD

III. Utilização da metodologia GeneXpert MTB/RIF® no diagnóstico da Tuberculose Resistente à Rifampicina.



ATA - DEFESA DE MONOGRAFIA DE PROJETO FINAL		
NOME DO GRADUANDO (A)		MATRÍCULA
Thatiana Alfena de Souza		12114020297
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB – UFRJ – EAD – POLO DUQUE DE CAXIAS		
TÍTULO DA MONOGRAFIA		
Avaliar a Metodologia GeneXpert MTB/RIF® para a detecção de resistência à Rifampicina ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
NOME DOS MEMBROS DA BANCA	TÍTULO	ASSINATURA
Orientador Bianca Porfírio da Costa	Mestre	<i>Bianca Porfírio da Costa</i>
Ingrid Siciliano Horbach	Mestre	<i>Ingrid Siciliano Horbach</i>
Luciana Distasio de Carvalho	Mestre	<i>Luciana Distasio de Carvalho</i>
		Data: 03/12/2018
<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO (A)		<input type="checkbox"/> REPROVADO (A)
HAVENDO SUGESTÕES NA DEFESA, COLOCAR TÍTULO MODIFICADO DA MONOGRAFIA		
<i>Utilização da metodologia GeneXpert MTB/RIF® no diagnóstico da tuberculose resistente a rifampicina</i>		
Sr.(a) Coordenador (a): encaminho, em anexo, a versão revisada do Trabalho Final de Curso nos formatos impresso e digital . Atesto que tal versão contempla as sugestões e/ou observações feitas pela banca durante a defesa.		
ASSINATURA DO ORIENTADOR		
<i>Bianca Porfírio da Costa</i>		
LOCAL E DATA <i>Rio de Janeiro, 03/12/2018</i>		
ASSINATURA DO COORDENADOR DO CURSO		
LOCAL E DATA		

Dedico este trabalho ao meu namorado, Leandro, meu amor e porto seguro. A minha família, em especial a minha mãe, Luzia, por segurar na minha mão nas horas mais difíceis e ser a minha maior incentivadora. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me guiou, me deu discernimento e serenidade mesmo diante de todas as dificuldades que apareceram ao longo do caminho.

À minha família: mãe, irmão, irmã, pai e sobrinhas lindas, minha eterna gratidão por terem me ajudado a chegar até aqui e por sempre se preocuparem. Eu amo todos vocês!

Ao meu amor e companheiro de vida, Leandro, por toda cumplicidade, paciência, incentivo, força, carinho, admiração e amor. Sem o seu apoio incondicional eu não teria conseguido ir tão longe nessa jornada. Te amo!

À minha “filha” de quatro patas, Bia, que partiu esse ano me deixando uma imensa saudade e lembranças de quinze anos vividos ao seu lado de muitas alegrias e aprendizado.

À Tairini, Nicole, Luciana e Jade que são muito mais do que companheiras de trabalho, são amigas para todas as horas. Muito obrigada pelo apoio e carinho de vocês.

Aos meus amigos de faculdade conquistados ao longo de todos esses anos: Márcia, Kátia, Jéssica, Luana, Luanda, Sérgio, Indaleto, André, Andreia, Isabella. Por todos esses anos aprendemos a nos ajudar e compartilhar todas as angústias e celebrar as nossas conquistas. Vocês fazem parte da minha história e muito obrigada por me ajudar a alcançar esse sonho.

Obrigada ao consórcio CEDERJ pela oportunidade de acesso ao ensino superior de qualidade pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, e aos coordenadores e tutores presenciais e à distância sempre presentes e envolvidos nas questões acadêmicas. Aos colegas e amigos do curso de graduação, e foram muitos na trajetória deste caminho, que dividiram comigo expectativas, sonhos, decepções e a vontade de fazer tudo dar certo, principalmente os amigos da turma 2012/1 que seguem comigo até aqui. Muitos deles aprendi a admirar e continuarão fazendo parte da minha vida.

À minha orientadora sensacional, Bianca. Você é muito mais que a minha orientadora, mas sim uma amiga querida e muito especial que a vida me deu. Companheira de tantos momentos felizes e tristes. Sem você eu não teria conseguido terminar esse trabalho, pensando bem... Nem teria conseguido começar. Desculpa-me por toda procrastinação. Eu sei como você ficou preocupada em eu não conseguir respeitar o prazo. Muito, muito obrigada por tudo! Você é um ser humano maravilhoso, de alma nobre, e uma profissional admirável.

Ao Dr. Paulo Redner, por sempre estar disponível para ajudar a todos o que pedem ajuda. Uma pessoa bondosa, prestativa, engraçada e extremamente inteligente. Obrigada pelo apoio... E pela carona! Um grande amigo que eu ganhei nesses anos de laboratório. Obrigada por tudo.

Ao Luiz Cláudio, um amigo incrível e companheiro de trabalho. Muito obrigada pelo incentivo e por toda a sua ajuda. Você faz parte dessa conquista.

À Reginalda, uma amiga e companheira de trabalho. Muito obrigada pela sua torcida e por todo carinho.

À Dra. Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes, que me recebeu no laboratório de braços abertos. Sempre disposta a me ensinar e ajudar. Sempre preocupado e perguntado como eu estava. O seu carinho, incentivo e apoio foram fundamentais para eu me adaptar no laboratório. Obrigada por toda a confiança depositada em mim e por todo aprendizado.

A todos do CRPHF, a Fatima Martins – chefe do laboratório, que sempre me trataram muito bem e agregaram um enorme conhecimento na minha vida profissional. Todos sempre muito atenciosos e dispostos a me ensinar. Muito obrigada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O Gênero <i>Mycobacterium</i>	1
1.2. Tuberculose	3
1.3. Epidemiologia no Brasil e no Mundo.....	4
1.4. Prevenção e Tratamento	6
1.5. Resistência aos Antibióticos.....	8
1.6. Métodos Fenotípicos e Genotípicos para Detecção de Resistência.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivos Gerais	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Fluxograma	17
3.2. Amostras do estudo	18
3.3. Repique das amostras selecionadas	18
3.4. Teste de sensibilidade pelo sistema BACTEC MIGHT 960	18
3.5. Comparação e Análise dos Dados	19
4. CONSIDERAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA	20
5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÕES	30
8. REFERÊNCIAS.....	31

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Fatores que influenciam a efetividade do tratamento da tuberculose	08
Quadro 2. Genes envolvidos na resistência a fármacos antituberculose	13
Tabela 1. Resultado do crescimento bacteriano e do teste de sensibilidade no MGIT 960	23

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Bacilos retos ou levemente curvados corados por fucsina	01
Figura 2. Parede celular do <i>M. tuberculosis</i>	02
Figura 3. Colônias de <i>M. tuberculosis</i> em meio Löwenstein-Jensen	03
Figura 4. Estimativa do coeficiente de incidência de tuberculose no mundo em 2015	06
Figura 5. Porcentagem de novos casos de TB - MDR	09
Figura 6. Porcentagem de casos de tuberculose anteriormente tratados	10
Figura 7. Região <i>hotspot</i> do gene <i>rpoB</i>	15
Figura 8. Fluxograma do estudo	17
Figura 9. Gráfico 1 referente a porcentagem de crescimento das 150 cepas selecionadas após repique	22
Figura 10. Análise das amostras selecionadas	26
Figura 11. Gráfico 2 referente a porcentagem das 137 cepas positivas após o repique que foram submetidas ao TS de 1º linha	27
Figura 12. Gráfico 3 referente a porcentagem das 107 cepas RIF resistentes no TS	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMK – Amicacina

AIDS–*Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

BAAR - Bacilo Álcool Ácido Resistente

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

CAP – Capreomicina

CGPNCT – Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose

CRPHF – Centro de Referência Professor Hélio Fraga

CMTB – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

DNA – Ácido Dexorribonucléico

EMB – Etambutol

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GU – *Growth Unit* (unidade de crescimento)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

INH – Isoniazida

KAN – Canamicina

LJ - Lowenstein-Jensen

TB-MDR – Multidroga Resistente

MAS-PCR - *Multiplex allele-specific* – PCR

MIC – Mínima Concentração Inibitória

MNT – Micobactéria Não Causadora De Tuberculose

MTB – *Mycobacterium tuberculosis*

OFLO – Ofloxacina

OMS – Organização Mundial Da Saúde

Pb – Pares de Bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RIF – Rifampicina

SE - Sensível

SM – Estreptomicina

TB – Tuberculose

TBM – Tuberculose Meníngea

TB- MDR – Tuberculose Multidroga Resistente

TB-RR – Tuberculose Resistente à Rifampicina

TB-XDR – Tuberculose Extensivamente Resistente

TRM – Teste Rápido Molecular

TS – Teste de Sensibilidade

*“... É preciso amar as pessoas
Como se não houvesse amanhã
Porque se você parar para pensar
Na verdade não há ...”*

(Renato Russo)

RESUMO

A tuberculose até hoje se apresenta como uma das principais causas de morte provocada por um único agente infeccioso em todo o mundo. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo de Koch, o que equivale a mais de 2 bilhões de pessoas. Apesar de uma série de tratamentos eficazes, a tuberculose continua sendo uma das infecções bacterianas mais destrutivas em humanos. A grande preocupação no tratamento da tuberculose é o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos. As cepas MDR, são caracterizadas pela resistência à Isoniazida e Rifampicina, as duas drogas do tratamento primário mais potentes. Quanto mais rápido o diagnóstico, especialmente em casos de tuberculose resistente, mais cedo se poderá iniciar o tratamento, sendo o teste rápido molecular uma ferramenta de extrema importância para o diagnóstico precoce da doença. O objetivo desse trabalho foi avaliar a metodologia GeneXpert MTB/RIF® para a detecção de resistência à rifampicina comparando com o teste de sensibilidade aos antibióticos pelo Sistema BACTEC MGIT 960. Foram selecionadas 150 cepas previamente testadas no GeneXpert MTB/RIF® com resultado positivo para a resistência, e repicadas em meio de cultura sólido para posterior realização do teste de sensibilidade aos antibióticos para confirmação da resistência. Após o repique das 150 cepas selecionadas: 13 foram descartadas como contaminadas ou negativas (8,67%) e 137 cepas com crescimento positivo (91,33%). Das 137 cepas submetidas ao teste de sensibilidade a antibióticos: 30 amostras sensíveis a rifampicina (21,89%), 107 resistentes a rifampicina (78,11%) e 102 amostras MDR (95,32%). Os resultados obtidos demonstraram uma concordância de 78,11% para detecção da resistência a rifampicina entre os dois métodos. O GeneXpert MTB/RIF® mostrou-se uma ferramenta importante para a rápida detecção de *M. tuberculosis* e para mutações que possam conferir uma resistência a rifampicina podendo se iniciar o tratamento da doença precocemente, entretanto pesquisadores e médicos estão cientes das limitações do ensaio ao interpretar os resultados do teste GeneXpert MTB/RIF®, mais estudos são necessários para avaliar o desempenho do ensaio para a detecção de resistência a rifampicina em vários cenários clínicos e com grande número de espécimes.

Palavras chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Resistência, Multidroga Resistente (MDR), Teste de Sensibilidade (TS), GeneXpert MTB/RIF®, Teste Rápido Molecular (TRM), Rifampicina.

ABSTRACT

Tuberculosis is one of the leading causes of death from a single infectious agent worldwide. It is estimated that one-third of the world's population is infected by the Koch bacillus, which is equivalent to more than 2 billion people. Despite a number of effective treatments, tuberculosis remains one of the most destructive bacterial infections in humans. The major concern in the treatment of tuberculosis, is the emergence of antibiotic resistant strains. MDR strains are characterized by resistance to Isoniazid and Rifampicin, the two most potent primary treatment drugs. The faster the diagnosis, especially in resistant tuberculosis cases, the sooner treatment can be started, and the rapid molecular test is an extremely important tool for the early diagnosis of the disease. The objective of this study is to evaluate the GeneXpert MTB / RIF® methodology for the detection of resistance to rifampicin compared to the antibiotic susceptibility test by the BACTEC MGIT 960 System. We selected 150 strains previously tested on GeneXpert MTB / RIF® with a positive result for the resistance, and subcultured in solid culture medium for further performance of the antibiotic susceptibility test for confirmation of resistance. After subculture of the 150 selected strains: 13 were discarded as contaminated or negative (8.67%) and 137 strains had positive growth (91.33%). Of the 137 strains tested for antibiotic susceptibility: 30 samples were sensitive to rifampicin (21.89%), 107 were resistant to rifampicin (78.11%) and 102 were diagnosed as MDR (95.32%). The results obtained showed a concordance of 78.11% for the detection of resistance to rifampicin between the two methods. GeneXpert MTB / RIF® has been shown to be an important tool for rapid detection of *M. tuberculosis* and for mutations that may confer resistance to rifampicin, and early treatment of the disease may be initiated, however researchers and physicians are aware of the limitations of the assay. Interpret the results of the GeneXpert MTB / RIF® test, further studies are required to evaluate the performance of the assay for the detection of rifampicin resistance in various clinical scenarios and with a large number of specimens.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Resistance, Multidrug Resistance (MDR), Sensitivity Test (ST), GeneXpert MTB / RIF®, Rapid Molecular Testing, Rifampicin.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Gênero *Mycobacterium*

As bactérias do gênero *Mycobacterium* estão entre as de maior importância médica. Taxonomicamente as micobactérias estão inseridas na ordem dos *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterinae* e família *Mycobacteriaceae*. Este gênero é composto por mais de 160 espécies já descritas que são divididas em dois grupos, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e as micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT), responsáveis por desenvolver micobacterioses. Dentre as espécies do complexo *M. tuberculosis* que são consideradas patogênicas para o homem estão: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis BCG* e *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (ESTEBAN, J. & MUÑOZ-EGEA, M. C, 2016).

As micobactérias são bacilos retos ou levemente curvados, que apresentam de 1 a 10 micrômetros de comprimento por 0,3 a 0,6 micrômetros de largura. Normalmente são bacilos imóveis, não esporulados, aeróbios ou microaerófilos e que tem como característica principal a habilidade de resistência contra a descoloração quando são tratadas com álcool-ácido (Figura 1) (BROOKS, 2014).

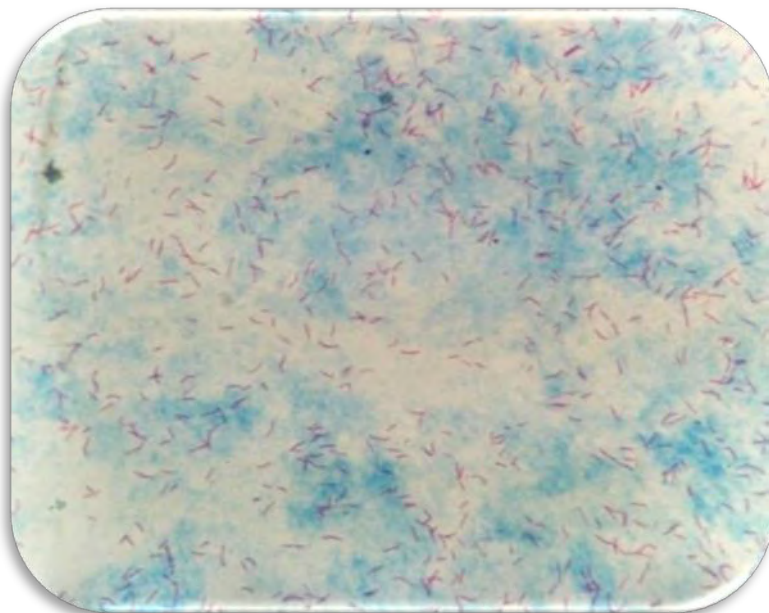


Figura 1 - Bacilos retos ou levemente curvados corados por fucsina

Fonte: Ferreira N.V., 2015.

Devido a essa resistência, as micobactérias não são classificadas como microrganismos Gram positivos ou Gram negativos, ou seja, não são coradas através da técnica de Gram, elas são denominadas bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e a técnica de coloração utilizada é a técnica de Ziehl-Neelsen. Essa característica é decorrente de sua parede celular que é composta por diversos lipídeos complexos e ácidos graxos de cadeia longa, chamados ácidos micólicos, que dão ao bacilo esta propriedade (Figura 2) (COELHO & MARQUES, 2006; BROOKS, 2014).

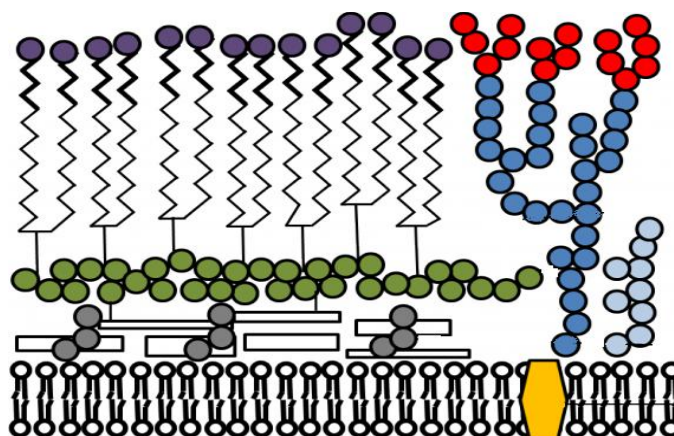


Figura 2 - Parede celular de *M. tuberculosis*

Fonte: <http://www.ff.ul.pt/tuberculose/files/2014/03/Parede-celular1.png>

M. tuberculosis cresce bem lentamente e a temperatura ótima para seu crescimento é de 36° a 37° Celsius. Seu tempo de geração varia entre 18 e 20 horas, enquanto a maioria das outras bactérias são capazes de se duplicar em 1 hora ou menos. Devido ao crescimento lento, as culturas devem ser mantidas de 6 a 8 semanas até que possam ser consideradas negativas. (LEVINSON, 2010).

A morfologia das colônias de *M. tuberculosis* se dá por um aspecto seco, rugoso e que não produz pigmentação, levando uma coloração creme em meio Lowenstein-Jensen (LJ) (Figura 3) (COELHO & MARQUES, 2006).

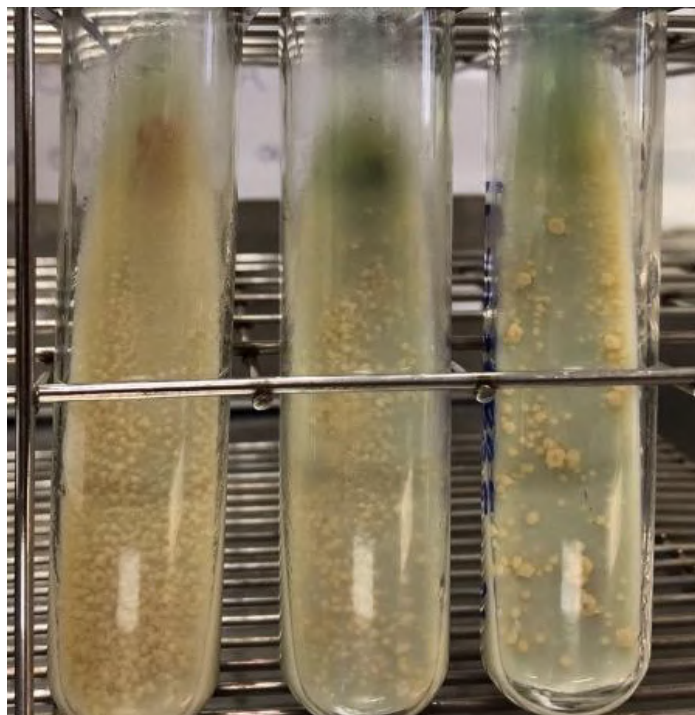


Figura 3 Colônias de *M. tuberculosis* em meio Löwenstein-Jensen
Fonte: PAIVA J.F, 2018.

1.2. Tuberculose

A tuberculose é uma doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e foi descoberta pelo alemão Robert Koch em 1822, por isso a origem do nome dado ao bacilo (Bacilo de Koch). Porém, acredita-se que o bacilo já circulava há milênios na humanidade (BLOOM & MURRAY, 1992; BRASIL, 2008).

É uma doença infectocontagiosa e que atinge principalmente os pulmões (tuberculose pulmonar), mas também pode afetar qualquer outro órgão (tuberculose extrapulmonar), sendo os de maior relevância as meninges (membranas que revestem o sistema nervoso central), os gânglios, sangue e rins (WHO, 2015).

A doença se espalha quando as pessoas que estão doentes com tuberculose pulmonar expõem bactérias no ar (aerossóis), por exemplo, tossindo. No geral, uma pequena proporção (5-15%) dos 2 bilhões de pessoas estimadas infectadas com *M. tuberculosis* irá desenvolver a doença durante a vida. No entanto, a probabilidade de

desenvolver tuberculose é muito maior entre as pessoas infectados pelo HIV (*Human Immunodeficiency Virus* – Vírus da Imunodeficiência Humana) e, também, maior entre as pessoas afetadas por fatores de risco como subnutrição, diabetes, tabagismo e consumo de álcool (LEMOS, 2008; WHO, 2017).

Nos últimos cinco anos, tem sido a principal causa de morte por um único agente infeccioso, ranking acima do HIV / AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Isto apesar do fato de que, com um diagnóstico oportuno e tratamento correto, a maioria das pessoas que desenvolvem poderiam ser curadas (WHO, 2017).

As razões para a carga global de tuberculose incluem: pobreza e discrepância crescente entre ricos e pobres em várias populações, populações que se deslocaram para áreas urbanas, negligência na gestão da doença, colapso das infraestruturas da saúde nos países com graves crises econômicas ou com instabilidade civil e o impacto da pandemia de HIV (BRASIL, 2014).

Uma das maiores dificuldades para o controle da tuberculose é conseguir reduzir o número de casos de pessoas que abandonam o tratamento. Isso leva a uma persistência da fonte de infecção, ao aumento das taxas de tuberculose recidivas (retorno da doença no pós-cura) e facilita o desenvolvimento de cepas resistentes aos medicamentos usados no tratamento (SÁ, 2007).

1.3. Epidemiologia no Brasil e no Mundo

A tuberculose é uma das dez principais doenças que causam morte no mundo. Estima-se que um terço da população mundial está infectada pelo bacilo de Koch, o que equivale a mais de 2 bilhões de pessoas. A região com maior risco para o adoecimento é a Ásia, seguida pela África, com 45% e 25% respectivamente (WHO, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica que 22 países agrupam 80% dos casos de tuberculose. O Brasil está incluso neste grupo, ocupando a 15ª posição em número total de casos (WHO, 2015).

Em 2016, 10,4 milhões de pessoas adoeceram com tuberculose, sendo 90% adultos, 65% homens, 10% pessoas vivendo com HIV. Destes 56% vivem em cinco países: Índia, Indonésia, China, Filipinas e Paquistão. Dentro desses números 1,7 milhões foram a óbito devido à doença, sendo 0,4 milhão de pessoas infectadas pelo HIV (WHO, 2017; WHO, 2018).

Apesar de ser uma doença com disponibilidade de tratamento eficaz, a tuberculose ainda constitui um importante problema de saúde pública, já que o número de notificações de novos casos vem aumentando. A relação de pacientes soropositivos com tuberculose e o aparecimento de diversos casos de tuberculose multidroga resistente (TB-MDR) agravam ainda mais o problema da doença no mundo (WHO, 2017).

A tuberculose é a principal causa de morte entre pessoas soropositivas. Em 2016, 40% das mortes por HIV foram devido a tuberculose. Os casos de TB-MDR também vêm se agravando e a OMS estima que 600.000 novos casos de tuberculose resistente a rifampicina (TB-RR) surgiram, sendo a rifampicina uma das principais drogas do tratamento de primeira linha (WHO, 2018).

Novas estratégias globais estão sendo criadas para o enfrentamento da tuberculose e o Brasil tem grande participação, já que apresenta um dos maiores números de casos da doença. Como parte do esforço para a diminuição do coeficiente de incidência e mortalidade, o Ministério da Saúde, por meio da Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (CGPNCT) gerou um plano nacional que visa chegar a menos de 10 casos por 100 mil habitantes até o ano de 2035 (WHO, 2017).

Em 2015 foram diagnosticados e registrados 63.189 novos casos de tuberculose no Brasil. O coeficiente de incidência da tuberculose no Brasil caiu de 38,7 em 2006 para 30,9 casos por 100 mil habitantes em 2015 (Figura 4). No entanto, para o alcance dos primeiros objetivos da estratégia, faz-se necessária a redução média anual de 4% a 5% até 2020 (WHO, 2015).

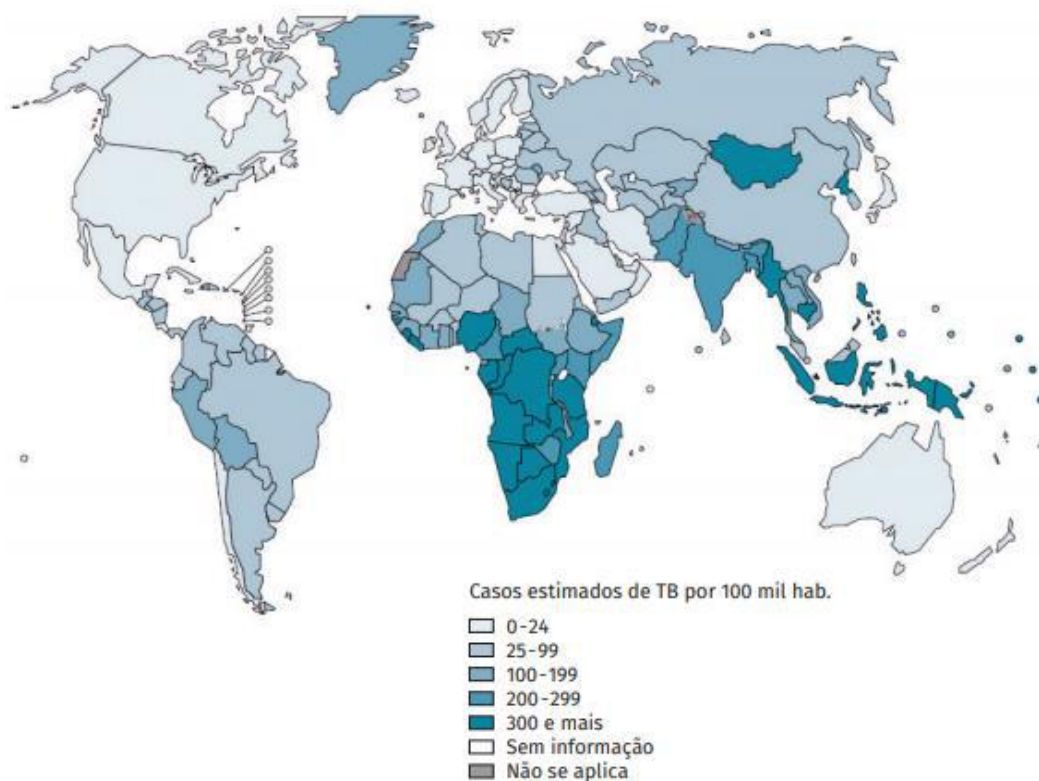


Figura 4 - Estimativa do coeficiente de incidência de tuberculose no mundo em 2015

Fonte: Ministério da Saúde, 2017.

1.4. Prevenção e Tratamento

O diagnóstico, tratamento precoce, o tratamento da infecção latente e a vacina Bacilo Calmette Guerin (BCG) são medidas de controle disponíveis. A vacina BCG foi desenvolvida entre os anos de 1906 e 1919, por Camille Calmett e Albert Guerin, no Instituto Pasteur em Paris. No ano de 1921 a vacina produzida com *M. bovis* atenuado começou a ser utilizada em humanos, recebendo o nome de BCG (DALCOMO *et al.*, 2007).

A BCG é utilizada na prevenção da tuberculose em crianças e impede as formas graves da doença, como a meníngea, a miliar e a forma pulmonar progressiva. Já nos adultos, a vacina não apresenta uma eficácia relevante na prevenção da TB pulmonar. A Organização Mundial da Saúde (OMS) em parceria com a *Stop TB* vem trabalhando para desenvolver outras vacinas que substituam a BCG ou que atuem em conjunto com

ela. Existem 17 medicamentos em ensaios clínicos, incluindo oito novos compostos. Vários novos esquemas de combinação estão em ensaios de Fase II ou Fase III e existem 12 candidatas a vacina em ensaios clínicos: três em Fase I e nove na Fase II ou Fase III (WHO, 2006; WHO, 2017).

A tuberculose já pode ser transmitida desde os primeiros sintomas respiratórios, por isso a importância do diagnóstico precoce, já que, após o início do tratamento efetivo o risco de transmissão é reduzido. Durante muito tempo foi considerado que após 15 dias de tratamento a doença não era mais transmitida, porém, com os casos crescentes de resistência aos antibióticos foi chegada à conclusão de que é necessária a negatificação da baciloscopia para isso (BEHR *et al.*, 1999; BRASIL, 2011).

De acordo com o metabolismo e local onde o bacilo se localiza, o esquema terapêutico antituberculose (anti-TB) precisa diminuir a quantidade de bacilos rapidamente e conseqüentemente reduzir a infecção e prevenir os bacilos resistentes. Devido a isso, medicações associadas são utilizadas no tratamento (BRASIL, 2011).

A tuberculose normalmente é tratada com a associação de quatro fármacos: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol durante seis meses, sendo dividido em fase intensiva, onde se utilizam os quatro fármacos por dois meses e fase de manutenção, onde se faz a administração de rifampicina e isoniazida por quatro meses. O tratamento da tuberculose que é causada por cepas sensíveis de MTB é eficaz em mais de 95% dos casos, porém, é um tratamento longo e que gera muitos efeitos adversos aos pacientes (DALCOMO *et al.*, 2007).

Se essas drogas forem mal prescritas ou no caso de abandono do tratamento pelos pacientes e TB recidiva, é possível administrar outros grupos de tratamentos, como por exemplo: No grupo das fluoroquinolonas são utilizados os antibióticos levofloxacina, gatifloxacina ou moxifloxacina, podendo durar o tratamento por até um ano e meio (BRASIL, 2011).

Em relação ao comportamento metabólico e a localização do bacilo, o esquema terapêutico antituberculose deve atentar para três grandes objetivos, que são: ter uma atividade bactericida precoce, que é a capacidade de matar o maior número de bacilos o mais rápido possível, diminuindo a infecção; ser capaz de prevenir os bacilos

resistentes, onde entra em ação a combinação de diferentes fármacos anti-TB e ter atividade esterilizante, que é a capacidade de eliminar virtualmente todos os bacilos de uma lesão (BRASIL, 2011).

A maioria dos pacientes diagnosticados com TB que seguem o tratamento de forma correta, obtém sucesso e conseguem chegar à cura. Porém, alguns fatores podem influenciar a efetividade do tratamento da doença, como, a não utilização dos fármacos, o uso inadequado dos mesmos e as condições de armazenamento ou interrupção dos medicamentos, assim podendo selecionar mutações na bactéria, levando a uma resistência aos antibióticos e propagando a transmissão de cepas resistentes (Quadro 1) (RABAHI et al., 2017).

Quadro 1 - Fatores que influenciam a efetividade do tratamento da tuberculose

RELACIONADOS AO PACIENTE
Idade, comorbidades, estado imunológico, estado nutricional, ingestão abusiva de álcool, adesão ao tratamento e tolerância aos fármacos
Características genéticas de absorção e metabolismo dos fármacos e vulnerabilidade individual as toxicidades
RELACIONADOS AO BACILO/APRESENTAÇÃO DA DOENÇA
Virulência do bacilo
Susceptibilidade da cepa
Extensão radiológica da doença e presença de cavidades
RELACIONADOS AO ATENDIMENTO
Capacidade motivacional da equipe, acesso do paciente ao sistema de saúde e supervisão do tratamento
RELACIONADOS AO TRATAMENTO
Quantidade de cada fármaco administrado, concentração plasmática dos fármacos administrados; ligação dos mesmos às proteínas, <i>clearance</i> , metabolismo e absorção
Questões de biodisponibilidade dos fármacos da apresentação (comprimidos separados, comprimidos em dose fixa combinada) e interação medicamentosa com outros fármacos
Regime de tratamento utilizado (diário ou intermitente), que influencia na duração e na frequência da administração dos fármacos; potência bactericida e esterilizante; e sinergia ou antagonismo entre os fármacos

Fonte: RABAHI *et al.*, 2017

1.5. Resistência aos Antibióticos

Apesar do desenvolvimento de uma série de tratamentos eficazes ao longo do último meio século, a tuberculose continua a ser uma das infecções bacterianas mais destrutivas em humanos. A grande preocupação no tratamento da tuberculose é o surgimento de cepas resistentes onde os primeiros casos de monorresistência começaram na década de 50 (DALCOMO *et al.*, 2007).

Desde quando a rifampicina foi introduzida como tratamento da TB, os casos de resistência a isoniazida e rifampicina vem aumentando de maneira considerável. Em 2016, a OMS orientou que pacientes com tuberculose resistente à rifampicina, com ou sem resistência a outras drogas, fossem tratados em um regime de tratamento para TB-MDR.

Estudos foram realizados com objetivo de avaliar o progresso na detecção de casos com TB resistentes a medicamentos e cobertura de tratamento. No ano de 2015, estima-se que tenham surgido 3,9% de novos casos e 21% de casos já tratados anteriormente de TB-MDR, como mostram as Figuras 5 e 6 (BRASIL, 2011; LEIBA et al., 2014; VILCHÈZE, 2014; WHO, 2018).

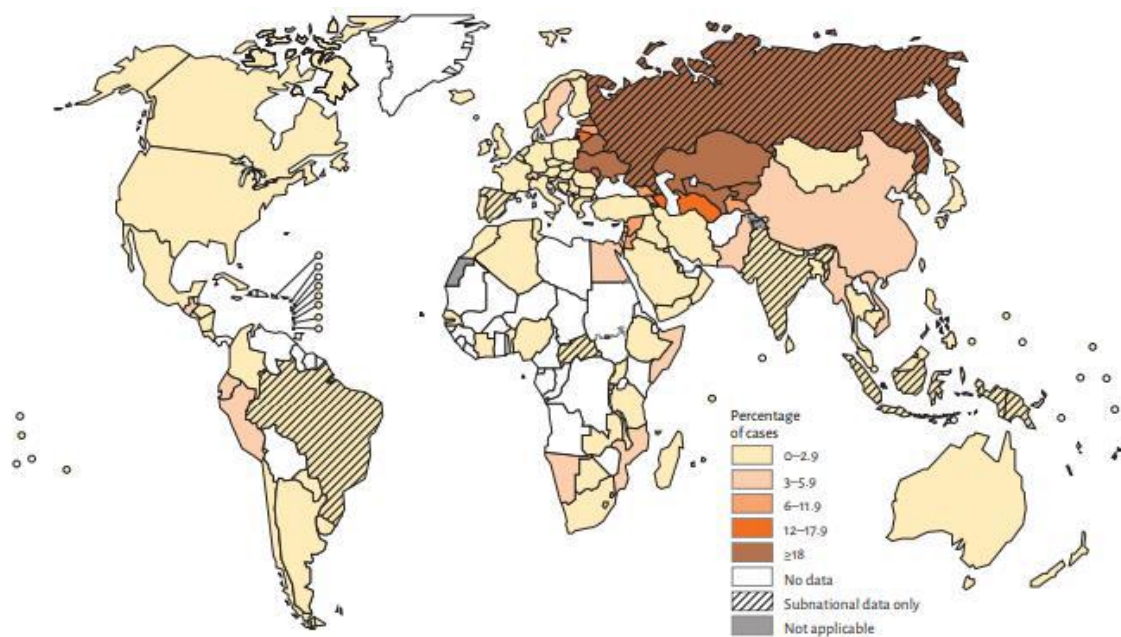


Figura 5 - Porcentagem de novos casos de TB-MDR

Fonte: WHO, 2015

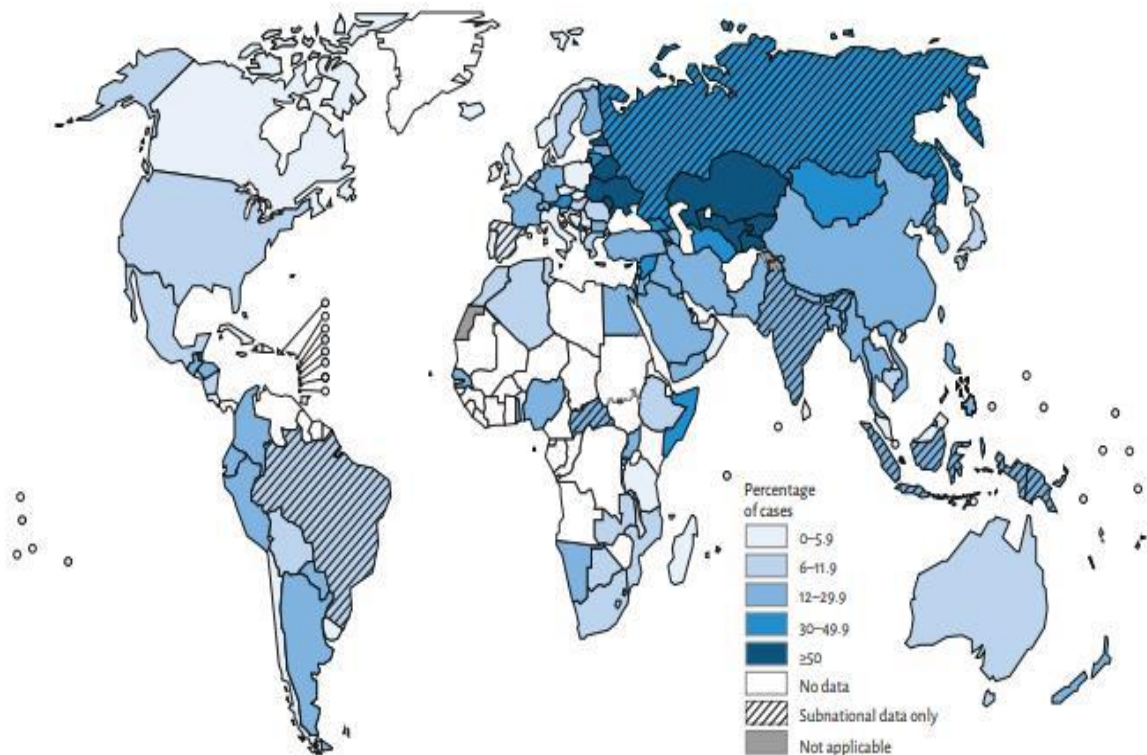


Figura 6 - Porcentagem de casos de tuberculose anteriormente tratados

Fonte: WHO, 2015

A classificação de resistência aos antibióticos se apresenta da seguinte forma de acordo com a OMS:

- Monorresistente – Quando a cepa apresenta resistência a apenas um dos fármacos antituberculose;
- Rifampicina Resistente (RR) – Quando a cepa apresenta resistência somente para rifampicina;
- Polirresistente – Quando a cepa apresenta resistência para dois fármacos antituberculose que não a combinação de isoniazida e rifampicina;
- Multidroga Resistente (TB-MDR) – Quando a cepa apresenta resistência a isoniazida e rifampicina;
- Extensivamente Resistente (TB- XDR) – Quando a cepa apresenta resistência a isoniazida e rifampicina (TB-MDR) associada a uma fluoroquinolona

(moxifloxacina, gatifloxacina ou levofloxacina) e a um aminoglicosídeo injetável (canamicina, amicacina ou capreomicina) (BRASIL, 2011; VILCHÈZE, 2014; D'AMBROSIO et al., 2015; WHO, 2018).

Embora a resistência aos antibióticos seja uma potencial ameaça aos esforços destinados a controlar a disseminação da bactéria, não está claro como a resistência aos medicamentos afeta a dinâmica da doença. O efeito de eventos mutacionais que levam fenótipos resistentes a antibióticos, pode ou não ter um efeito previsível sobre a adequação de cepas de tuberculose resistentes a drogas. Grande parte desse debate está centrada na "adequação" relativa das cepas resistentes aos medicamentos. Se as mutações que levam à resistência a múltiplos fármacos exercem um custo sobre a eficácia reprodutiva do organismo, podemos esperar que essas cepas sejam transmitidas de forma menos ampla do que as cepas sensíveis à droga (ROSSETTI et al., 2002; LANGE et al., 2018).

1.6. Métodos Fenotípicos e Genotípicos para Detecção de Resistência

O conhecimento das taxas de resistência permite avaliar a qualidade dos programas de controle da tuberculose de um país e possibilita a modificação de esquemas terapêuticos vigentes. A realização de testes de sensibilidade é indicada em casos de pacientes com suspeita de resistência, por abandono, por falência de tratamento, por recidiva ou por ser contato de um caso de tuberculose resistente (BRASIL, 2008). A sensibilidade de *M. tuberculosis* aos fármacos pode ser avaliada por métodos fenotípicos e moleculares.

- Métodos fenotípicos no diagnóstico da resistência

O Método das Proporções foi descrito por Canetti, Rist e Grosset em 1963, sendo um método fenotípico de detecção da resistência às drogas utilizadas no tratamento primário da Tuberculose. O princípio do método consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes contidos em uma amostra de *M. tuberculosis*, em uma

determinada concentração da droga que é capaz de inibir o crescimento das células bacterianas sensíveis, mas não o das células bacterianas resistentes – “concentração crítica”. Para cada droga foi definida uma proporção de mutantes resistentes em uma população bacilar, igual ou acima da qual a amostra é considerada resistente – “proporção crítica”. A versão do método das proporções em meios de cultura sólidos à base de ovos (Löwenstein-Jensen – LJ) é a mais utilizada na maioria dos países da América Latina, incluindo o Brasil. Para o método das proporções, emprega-se o meio LJ sem droga e com droga. O meio sem droga permite conhecer o número total de bacilos semeados e o meio com droga, o número de mutantes resistentes à droga correspondente. As drogas utilizadas no teste de sensibilidade são as do esquema de tratamento de primeira linha (SM, INH, RMP e EMB). No entanto, para poder interpretar o resultado do teste de sensibilidade é necessário que aconteçam duas condições simultaneamente: crescimento suficiente (mais de 100 colônias) no tubo controle (LJ sem droga) semeado com a diluição mais concentrada (10^{-3}), para que seja possível detectar mutantes resistentes que estejam em menor porcentagem (cerca de 1%) entre os bacilos inoculados e colônias separadas e contáveis no tubo controle (LJ sem droga) semeado com a diluição menos concentrada (10^{-5}). Essa condição é indispensável quando aparecem colônias resistentes cuja proporção deve ser determinada (cálculo da porcentagem). A primeira leitura é feita com 28 dias de incubação para ver se houve desenvolvimento de colônias suficiente para interpretar os resultados. Se houve casos de resistência com contagem de colônias suficiente para interpretar o resultado, este pode ser emitido nesse período. Se não houve resistência (as cepas eram sensíveis a todas as drogas testadas), aguarda-se a segunda leitura ao final de 42 dias. Essa precaução é para assegurar o aparecimento tardio de colônias mutantes resistentes. É considerado o padrão ouro para a confirmação da resistência (Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias/M.S, 2008).

Outro tipo de método fenotípico é o Sistema BACTEC MGIT 960, que é um sistema semi-automatizado para detecção de crescimento de micobactérias e teste de sensibilidade a drogas para *M. tuberculosis*. O MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) consiste em meio líquido, o qual as micobactérias crescem mais rapidamente (SIDDIQI & RÜSCH-GERDES, 2006). O teste realizado pelo sistema BACTEC MGIT 960 baseia-se no princípio da relação entre o consumo de oxigênio e a quantidade de

bactérias. Resumidamente, o tubo de MGIT contém um anel de silicone contendo um sensor fluorescente cuja emissão é inibida em presença de oxigênio. Ao adicionar micobactérias ao tubo, o crescimento bacteriano acarretará no consumo de oxigênio, o que resultará na emissão proporcional de fluorescência, que será detectada pelo detector do aparelho a cada 60 minutos (SIDDIQI & RÜSCH-GERDES, 2006). O equipamento interpreta o resultado do teste de sensibilidade quando a unidade de crescimento (GU; *Growth Unit*) no tubo controle atinge o valor de 400 (geralmente entre 4 e 13 dias). O aparelho então interpreta os resultados dos tubos com antibióticos em sensíveis (quando o valor da GU do tubo for inferior a 100) e resistentes (quando o valor da GU do tubo for igual ou superior a 100). Os preços do aparelho e dos reagentes são excessivamente altos para a maioria dos estabelecimentos públicos o que impede seu uso de forma sistemática (SIDDIQI & RÜSCH-GERDES, 2006).

- Métodos moleculares no diagnóstico de resistência do MTB

Os mecanismos genômicos associados à multirresistência do *M. tuberculosis* geralmente envolvem mutações nos genes que codificam determinadas proteínas, que são inibidas pelos fármacos. As mutações podem produzir trocas de aminoácidos, que geram uma proteína com menos atividade ou menos afinidade pelo fármaco, ou modifica a ação dos promotores dos genes, alterando a sua expressão gênica. Alguns dos genes envolvidos na resistência a determinados fármacos no tratamento anti-TB podem ser observados no quadro 1. (SMITH *et al.*, 2013)

Quadro 2 - Genes envolvidos na resistência a fármacos antituberculose

Antibióticos	rpoB	katG	inhA	embB	pncA	rrs	eis	tlyA	gyrA
RIFAMPICINA	■								
ISONIAZIDA		■	■						
ETAMBUTOL				■					
PIRAZINAMIDA					■				
AMICACINA						■			
KANAMICINA						■	■		
CAPREOMICINA						■		■	
CIPROFLOXACINA									■
OFLOXACINA									■

Legenda: Quadro relacionando os principais genes envolvidos na resistência aos antibióticos.

Um método rápido para diagnóstico de mutações é o *Genotype MTBDRplus* e o *GenoType® MTBDRsl* (*Hain Lifescience*, Alemanha) que consiste na detecção de mutações específicas notoriamente associadas com a resistência aos fármacos de primeira e segunda linha respectivamente. Este método depende de instalações apropriadas e de kits que são de alto custo para uso em instituições públicas. O *MTBDRplus* detecta mutações no gene *rpoB* (para rifampicina) e nos genes *KatG* e *inhA* (para isoniazida), o *MTBDRsl* detecta mutações em fluoroquinolonas, drogas injetáveis de segunda linha (canamicina, amicacina e capreomicina) e etambutol (JAVED H. *et al.* 2018)

O método *Multiplex allele-specific – PCR* (MAS-PCR) é rápido e simples para o diagnóstico de resistência do MTB. Foi inicialmente descrito para identificação de mutações no genoma humano que causavam fibrose cística (CREMONESI *et al.*, 1992). Este método foi posteriormente adaptado por Mokrousov e colaboradores para o diagnóstico de resistência de MTB a etambutol, isoniazida, rifampicina e fluoroquinolonas. A técnica consiste na realização de várias reações de PCR em um só tubo, usando um oligonucleotídeo reverso longo e diversos oligonucleotídeos diretos pequenos e específicos para o diagnóstico de mutações nos códons de interesse. Uma característica importante do método é a necessidade de existir em algumas regiões do DNA em que incidam grande quantidade de mutações, denominadas de “regiões *hotspot*”. O método é rápido e pode ser implantado em laboratório comum de biologia molecular, sem gastos excessivos. (BROUDE *et al.*, 2002).

A rifampicina (RMP) é extremamente efetiva contra *M. tuberculosis*, com MIC de 0,1 µg/ml a 0,2 µg/ml, e possui uma atividade bactericida rápida, eliminando bactérias persistentes (ação esterilizante). A RMP liga-se à subunidade β da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB*, inibindo a etapa de transcrição. A resistência à rifampicina (RMP) vem aumentando e 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. Até o momento, foram realizados vários estudos para caracterizar as linhagens resistentes e sensíveis à RMP. Uma compilação dos dados disponíveis indicou que 96% dos *M. tuberculosis* resistentes ao fármaco, isolados de pacientes epidemiologicamente não relacionados, apresentaram

35 mutações diferentes localizadas em uma região central de 81 pares de base (pb) no gene *rpoB* (ROSSETI *et al.*, 2002).

A necessidade de métodos rápidos e confiáveis para o diagnóstico de tuberculose levou o diagnóstico molecular a ter um forte papel complementar junto com testes convencionais (CAYCI, Y.T. 2017). Em 2014 foi implementado no SUS o GeneXpert MTB/RIF® ou Teste Rápido Molecular para Tuberculose (TRM-TB), um teste de triagem realizado a partir de uma amostra de escarro do paciente (CONITEC/SUS/Relatório n° 49, 2013). O TRM-TB é um teste de amplificação do DNA por PCR em tempo real e identificação de sequências de ácidos nucleicos alvo no genoma de TB e que, ao final, fornece os resultados em menos de 2 horas. Totalmente automatizado, o teste utiliza um cartucho que contém todos os elementos necessários para a extração do ácido dextrorribonucléico (DNA) do *M. tuberculosis* e faz uma análise se este DNA contém mutações em regiões do gene *rpoB* (região de 81 pares de base – *Hot Spot*) que mais frequentemente podem conferir uma possível resistência à Rifampicina. Apesar de métodos moleculares já serem tecnologias comprovadas no diagnóstico da TB, os métodos existentes são complexos para o uso na rotina de países em desenvolvimento. (WHO, 2016). O TRM-TB é um teste de triagem sendo necessária a confirmação do resultado pela cultura de micobactéria e teste de sensibilidade a antibióticos (*GeneXpert Dx System Operator Manual Book*, 2012).

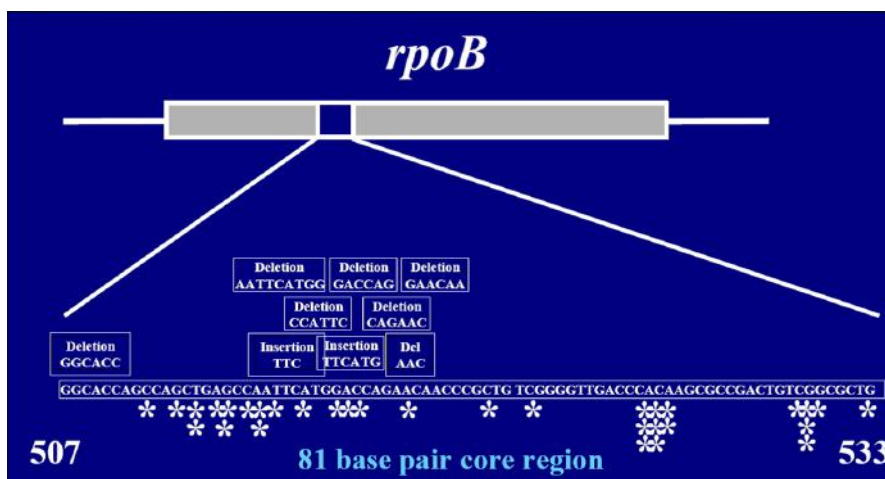


Figura 7: Região hotspot do gene *rpoB*.

Fonte: http://www.filha.fi/sites/default/files/eskola_tuberkuloosin_diagnostiikka.pdf.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

- ✓ Avaliar a metodologia GeneXpert MTB/RIF® para detecção da resistência à Rifampicina ao *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Realizar o levantamento das cepas que foram identificadas como *Mycobacterium tuberculosis* e rifampicina resistente no GeneXpert MTB/RIF® que estão armazenadas no acervo de cepas do Laboratório de Referência Nacional de Tuberculose e Micobacterioses Ângela Maria Werneck CRPHF/ENSP/FIOCRUZ;
- ✓ Cultivar as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* selecionadas;
- ✓ Realizar teste de sensibilidade aos antibióticos das cepas selecionadas pelo Sistema BACTEC MGIT 960;
- ✓ Avaliar comparativamente os resultados obtidos entre o GeneXpert MTB/RIF® com o teste de sensibilidade a antibióticos no Sistema BACTEC MGIT 960.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fluxograma

Foram selecionadas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que haviam sido previamente submetidas ao teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF®, sendo detectada a presença de MTB e a resistência a rifampicina, e realizado teste de sensibilidade às drogas de primeira linha.

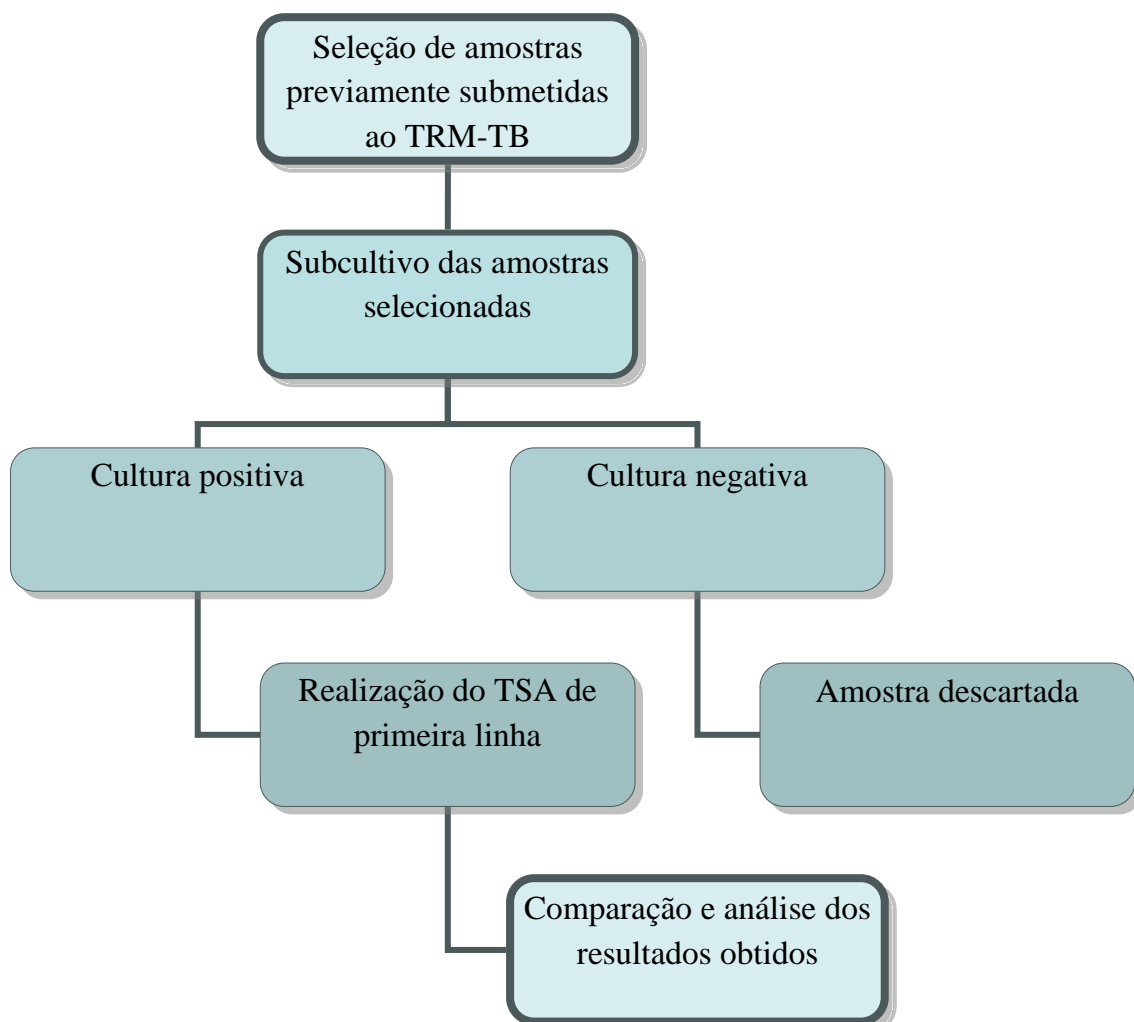


Figura 8: Fluxograma do estudo

Legenda: TSA – Teste de sensibilidade; TRM-TB (Teste Rápido Molecular ou GeneXpert MTB/RIF®)

3.2. Amostras do estudo

Foram selecionadas cento e cinquenta cepas de *M. tuberculosis*, isoladas a partir de amostras de escarro e líquidos biológicos, entre os anos de 2015 a 2016 que foram previamente submetidas ao teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF® (Teste Rápido Molecular), que compõem parte do acervo de cepas do Laboratório de Referência Nacional de Tuberculose e Micobacterioses Ângela Maria Werneck CRPHF/ENSP/FIOCRUZ, que estavam armazenadas em freezer -70°C.

3.3. Subcultivo das amostras selecionadas

As cepas de *M. tuberculosis* foram descongeladas e foram semeados 200µl de cada amostra em meio sólido Lowenstein - Jensen (LJ) a 36°C por 28 dias.

3.4. Teste de sensibilidade pelo sistema BACTEC MGIT 960

As cepas com crescimento positivo foram submetidas ao teste de sensibilidade para os fármacos de primeira linha (Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina e Etambutol) pelo Sistema BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickson & Company, New Jersey, USA).

A partir do crescimento em meio LJ foi emulsionada uma alça bacteriológica descartável estéril na massa bacteriana e feita uma suspensão homogênea de bactérias em um tubo com pérolas de vidro. Em seguida, a suspensão foi deixada em repouso por 10 minutos, para decantar as partículas maiores e para evitar dispersão de aerossóis. Foi retirado cerca de 1 mL do sobrenadante e gotejado no tubo da escala, ajustando a turvação da suspensão com o tubo nº 1 McFarland. Diluímos 1 mL da escala em 4 mL de água destilada estéril (suspensão 1:5) e 0,1 mL da suspensão de 1:5 em 10 mL de água destilada estéril (suspensão 1:100). Feito isso, foi inoculado no tubo MGIT o controle de crescimento, 0,5 mL da suspensão 1:100 e nos tubos contendo os fármacos, foi inoculado 0,5 mL da suspensão 1:5 em cada um dos tubos contendo Estreptomicina,

Isoniazida, Rifampicina e Etambutol. Ao final, todos os tubos foram incubados no sistema BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickson & Company).

3.5. Comparação e Análise dos Dados

Uma vez que todas as avaliações foram convertidas em valores numéricos, os dados foram dispostos em tabelas e gráficos para os perfis de sensibilidade e resistência das cepas usando o programa Microsoft Excel[®]. O programa também foi utilizado para a realização dos cálculos de comparação.

4. CONSIDERAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

Todas as etapas experimentais deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Referência Nacional de Tuberculose e Micobacterioses Ângela Maria Werneck CRPHF/ENSP/FIOCRUZ. Cada metodologia foi realizada em áreas de contenção biológica segundo o preconizado pelo Ministério da Saúde. Em detalhes, os procedimentos necessários para a realização dos testes de sensibilidade foram realizados em ambiente com Nível de Biossegurança 3 (Brasil, 2008).

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho não necessita de apreciação em comitês de ética uma vez que o objetivo é a avaliação de cepas de *M. tuberculosis* com diferentes padrões de resistência a antibióticos, utilizando para o estudo cepas de bactérias armazenadas no Laboratório de Referência Nacional de Tuberculose e Micobacterioses Ângela Maria Werneck CRPHF/ENSP/FIOCRUZ. Desta maneira, por não utilizar seres humanos em nenhuma etapa, este trabalho não apresenta requisitos para apreciação em Comitê de Ética em Pesquisa (Conselho Nacional de Saúde; Resolução N° 466, de 12 de Dezembro de 2012). E por não envolver a utilização de vertebrados (apenas bactérias), este trabalho não é aplicável para apreciação junto a Comissão de Ética no Uso de Animais (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal; Orientação Técnica N° 3, de 22 de Outubro de 2013).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cento e cinquenta cepas selecionadas para este estudo foram isoladas a 36°C por quatro semanas e avaliadas. Destas, 13 foram descartadas como contaminadas ou negativas (8,67%), conforme mostrado na Figura 9.

Porcentagem de crescimento das 150 cepas selecionadas após o subcultivo

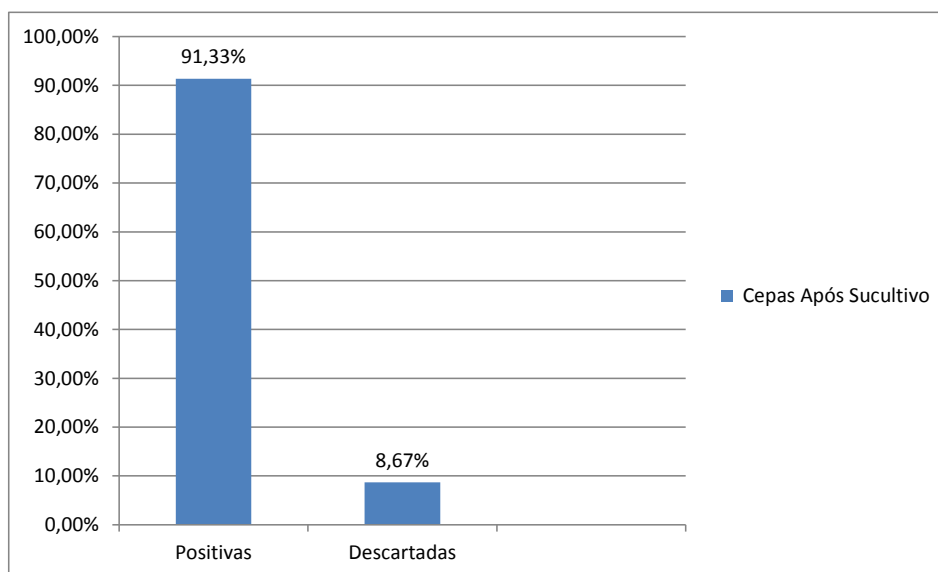


Figura 9: Gráfico 1.

Fonte: Própria.

As 137 cepas com crescimento positivo (91,33%) foram submetidas ao teste de sensibilidade para os fármacos de primeira linha (Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina e Etambutol) pelo Sistema BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickson & Company, New Jersey, USA) como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Resultado do crescimento bacteriano e do teste do TS no MGIT 960.

Número	Resultado	Resultado do TS
1	Positiva	IRE
2	Positiva	SIRE
3	Positiva	IR
4	Positiva	SIRE
5	Positiva	IR
6	Positiva	SIRE

7	Positiva	SIRE
8	Positiva	SIR
9	Positiva	IR
10	Positiva	IR
11	Positiva	IR
12	Positiva	IR
13	Positiva	IR
14	Positiva	SENSÍVEL
15	Positiva	IR
16	Positiva	SIR
17	Positiva	IR
18	Positiva	SIR
19	Positiva	SENSÍVEL
20	Positiva	SIRE
21	Positiva	SENSÍVEL
22	Positiva	I
23	Positiva	IR
24	Negativa	-
25	Positiva	IR
26	Positiva	R
27	Positiva	SIRE
28	Positiva	SIRE
29	Contaminada	-
30	Positiva	SENSÍVEL
31	Positiva	SIR
32	Positiva	IR
33	Positiva	SIRE
34	Negativa	-
35	Positiva	SIR
36	Contaminada	-
37	Positiva	IR
38	Positiva	IR
39	Positiva	IR
40	Positiva	I
41	Contaminada	-
42	Positiva	SIRE
43	Positiva	IR
44	Negativa	-
45	Positiva	IR
46	Positiva	IR
47	Positiva	I
48	Positiva	IR
49	Positiva	SIRE
50	Positiva	IR

51	Positiva	SIRE
52	Positiva	SENSÍVEL
53	Positiva	R
54	Positiva	SENSÍVEL
55	Positiva	IR
56	Positiva	IR
57	Positiva	SIRE
58	Positiva	IR
59	Positiva	S
60	Contaminada	-
61	Positiva	SI
62	Positiva	SENSÍVEL
63	Positiva	SIRE
64	Positiva	IR
65	Positiva	SIR
66	Negativa	-
67	Positiva	SIR
68	Positiva	IR
69	Positiva	SIR
70	Negativa	-
71	Positiva	SENSÍVEL
72	Positiva	SIR
73	Positiva	IRE
74	Positiva	IRE
75	Positiva	I
76	Positiva	I
77	Positiva	IR
78	Positiva	SIR
79	Positiva	SENSÍVEL
80	Positiva	I
81	Positiva	SNESÍVEL
82	Contaminada	-
83	Positiva	SIR
84	Positiva	IR
85	Positiva	IRE
86	Positiva	SIRE
87	Positiva	-
88	Positiva	IRE
89	Negativa	-
90	Positiva	IR
91	Positiva	IR
92	Positiva	IR
93	Positiva	IRE
94	Positiva	SENSÍVEL

95	Positiva	SI
96	Positiva	IRE
97	Positiva	SENSÍVEL
98	Positiva	R
99	Positiva	IRE
100	Positiva	SIRE
101	Positiva	SIRE
102	Positiva	SI
103	Positiva	SIR
104	Positiva	IRE
105	Positiva	IR
106	Positiva	IR
107	Positiva	IR
108	Positiva	SIRE
109	Positiva	IR
110	Positiva	IR
111	Positiva	IRE
112	Negativa	-
113	Positiva	IRE
114	Positiva	SIR
115	Positiva	IR
116	Positiva	SIR
117	Positiva	IR
118	Positiva	IRE
119	Positiva	IR
120	Positiva	IRE
121	Positiva	SIRE
122	Positiva	SENSÍVEL
123	Positiva	IR
124	Positiva	I
125	Positiva	IR
126	Positiva	SIRE
127	Positiva	SIRE
128	Positiva	IR
129	Positiva	SIR
130	Positiva	SIRE
131	Positiva	IR
132	Positiva	IR
133	Positiva	SENSÍVEL
134	Contaminada	-
135	Negativa	-
136	Positiva	IRE
137	Positiva	IR
138	Positiva	IR

139	Positiva	IR
140	Positiva	SENSÍVEL
141	Positiva	IR
142	Positiva	IR
143	Positiva	IR
144	Positiva	SIRE
145	Positiva	SENSÍVEL
146	Positiva	SENSÍVEL
147	Positiva	IRE
148	Positiva	IR
149	Positiva	S
150	Positiva	S

Legenda: S- Estreptomicina/ I- Isoniazida/ R- Rifampicina/ E- Etambutol.

Foi feita a comparação dos resultados obtidos através do TRM-TB para a detecção de mutação a rifampicina com a resistência microbiológica detectada através do MGIT pode ser visualizada na Figura 10.

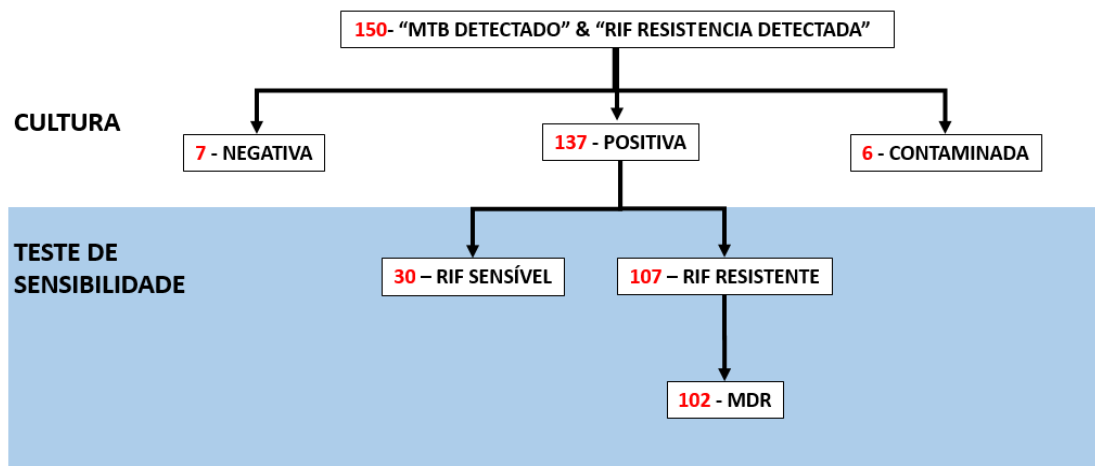


Figura 10: Análise das amostras selecionadas.

Fonte: Própria.

Onde observamos que das 137 amostras com crescimento positivo, 30 (21,89%) apresentaram sensibilidade a rifampicina no BACTEC MGIT 960 e 107 (78,11%) apresentaram resistência, como apresentado na Figura 11.

Porcentagem de amostras positivas ao TS de 1ª linha

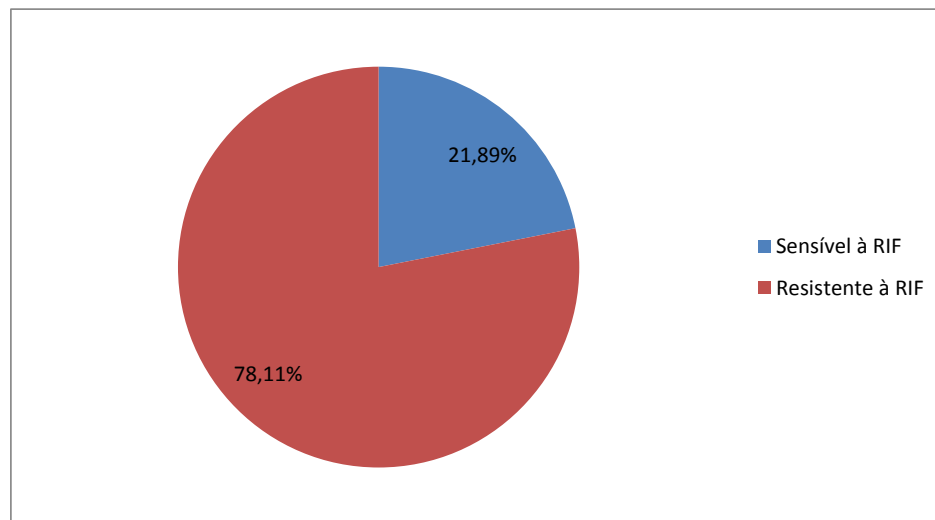


Figura 11: Gráfico 2.

Fonte: Própria.

Sendo que das 107 cepas com resistência a rifamicina, 102 (95,32%) foram classificadas como TB-MDR (isoniazida e rifamicina resistentes) e 5 cepas como TB – RR (rifamicina resistente) ou polirresistente (4,68%), como demonstrado na Figura 12.

Porcentagem das 107 cepas RIF resistentes no TS

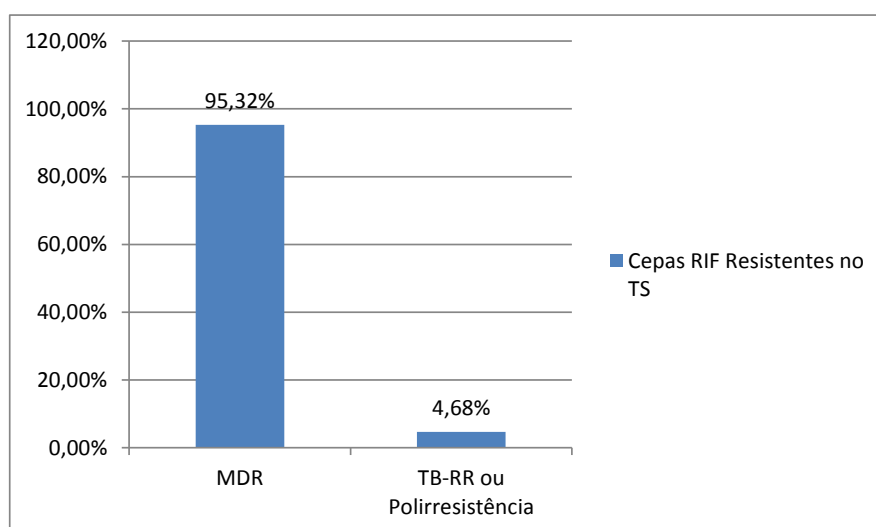


Figura 12: Gráfico 3.

Fonte: Própria.

Em nosso trabalho pode ser observado que das 137 cepas selecionadas como TB-MDR resistente a rifampicina e que tiveram um crescimento positivo para a realização do teste de sensibilidade, 107 apresentaram resistência, configurando uma concordância de 78,11%.

O mesmo pode ser observado em uma análise realizada por Aurin e colaboradores (2014) onde, entre 300 amostras selecionadas, 193 (64,3%) amostras foram resistentes a rifampicina no Genexpert MTB/RIF®, enquanto somente 189 (63%) amostras foram rifampicina resistente no teste de sensibilidade. Por outro lado, 191 (63,7%) isolados apresentaram resistência à isoniazida detectada através do teste de sensibilidade a drogas, sendo 187 considerados como cepas Genexpert MTB/RIF®. O método Genexpert MTB/RIF® teve uma concordância de 98,8% quando em comparação com o teste de sensibilidade, sendo assim considerado uma ferramenta eficiente na detecção de tuberculose resistente a drogas em Bangladesh.

No trabalho realizado por Bunsow e seus colaboradores em 2013 foram testadas no GeneXpert MTB/RIF® 81 amostras clínicas, sendo 71 amostras com resultado positivo para MTB. Destas 71 amostras positivas, 8 amostras também detectaram resistência à rifampicina. As 8 amostras foram submetidas ao Sistema BACTEC MGIT 960 para confirmação da resistência, tendo apenas 5 amostras confirmadas como resistentes a rifampicina e 3 apresentaram sensibilidade a rifampicina. Em nosso trabalho observamos que das 137 cepas positivas, com resultado prévio no TRM – TB como resistência a rifampicina, 30 (21,89%) cepas obtiveram resultado sensível após a confirmação pelo Sistema BACTEC MGIT 960.

O ensaio do GeneXpert MTB/RIF® detectou em 4/34 (11,7%) amostras como resistente a RIF no trabalho realizado por Cayci em 2017. A resistência foi conferida por duas mutações diferentes do gene *rpoB* dentro da região *hotspot*. No entanto, no sistema automatizado MGIT 960, a resistência RIF foi detectado em 3/34 isolados. O isolado RIF resistente no GeneXpert MTB/RIF®, entretanto, apresentou resultado sensível no sistema automatizado MGIT 960. Era uma amostra de escarro e também foi testada com método de proporção ágar para RIF resistência, tendo encontrado um resultado sensível a RIF. Também foram encontrados resistência à estreptomicina e

isoniazida, e sensível ao etambutol pelo MGIT 960. Os outros três isolados que eram resistentes ao RIF tanto no GeneXpert e no MGIT 960 encontraram resistência à estreptomicina, isoniazida e etambutol pelo sistema MGIT 960. Em nosso trabalho também observamos que das 107 cepas com resistência a rifampicina, 102 (95,32%) foram classificadas como TB-MDR.

No trabalho realizado por Nhu em 2014, mostrou que o GeneXpert MTB/RIF® é um teste rápido e específico para o diagnóstico de tuberculose meníngea (TBM), porém a sensibilidade dele reportada no trabalho é semelhante à sensibilidade de outras técnicas moleculares para o diagnóstico de TBM. O GeneXpert MTB/RIF® tem duas vantagens significativas: o formato baseado em cartucho fechado e a capacidade de detectar simultaneamente resistência ao *M. tuberculosis* e rifampicina.

7. CONCLUSÕES

O teste GeneXpert MTB/RIF® tornou-se um valioso ensaio de primeira linha para a detecção de *M. tuberculosis*. No entanto, microbiologistas e clínicos estão cientes das limitações do ensaio ao interpretar os resultados do teste GeneXpert MTB/RIF®, porque infecções pelo CMTB e infecções mistas podem ocasionar resultados falsos positivos e resultados negativos. Além de que a mutação fora da região *hotspot* do gene *rpoB* pode causar um resultado falso sensível. Mutações encontradas na região *hotspot* do gene *rpoB* podem não ser confirmadas em testes fenotípicos, uma vez que mutações nem sempre se traduzem em mudança nos aminoácidos que possam levar a uma resistência bacteriana, justificando os resultados resistentes a rifampicina no TRM-TB porém sensíveis no Sistema BACTEC MIGHT 960. Mais estudos são necessários para avaliar o desempenho do ensaio GeneXpert MTB/RIF® para a detecção de resistência à rifampicina em vários cenários clínicos e grande número de espécimes.

8. REFERÊNCIAS

ANDRADE, D.F.R; CARVALHO, M.L; ARAUJO, T..M.E; SOUSA, M.A.S; SÁ, L.C; ARAÚJO, E.J.B. **Vantagens e Usos do Teste Rápido Molecular para Tuberculose: Uma Revisão Bibliográfica.** Revista de Enfermagem da UFSM – Vol. 7, n° 1; 2017.

AURIN, T. H; MUNSHI, S. K; KAMAL, S. M. M; RAHMAN, M; HOSSAIN, S; MARMA, T; RAHMAN, F; NOOR, R. **Molecular Approaches for Detection of the Multi-Drug Resistant Tuberculosis (MDR- TB) in Bangladesh.** Plos One, 9(6):e99810, 2014.

BEHR, Marcel A. *et al.* **Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli.** Lancet. vol. 353, n. 9151, p.444–449. 1999.

BLOOM, Barry. R. & MURRAY, Christopher. J. L. **Tuberculosis: commentary on a reemergent killer.** Science, v. 257, n 5073, p.1055-1064, 1992.

BRASIL a, Ministério da Saúde, Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose.** 3ª ed., Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL b, Ministério da Saúde. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias.** 1ª ed., Brasília, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose do Brasil.** 1ª ed., Brasília, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. **Boletim Epidemiológico.** vol. 44, n. 2, p. 1-13, 2014.

BROUDE, N. E; ZHANG, L; WOODWARD, K; ENGLERT, D; CANTOR, C. R. **Multiplex Allele-specific target amplification based on PCR suppression.** Proc Natl Acad Sci U S A. 200; 98 (1): 206-11.

BROOKS, Geo. F; *et al.* **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg.** 26^a ed. Artmed, Porto Alegre, p. 313-316, 2014.

BUNSOW, E; RUIZ-SERRANO, M. J; ROA, P. L; KESTLERK, M; VIEDMA, D. G; BOUZA, E. **Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the detection of Mycobacterium tuberculosis and resistance to rifampin in clinical specimens.** Elsevier, 68, 338 e 343, 2013.

CAYCI Y. T; BILGIN K; COBAN A. Y; BIRINCI A; DURUPINAR B. **An evaluation of false-positive rifampicina resistance on the Xpert MTB/RIF.** Memória Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 112(11): 756-759, 2017.

COELHO F. S; MARQUES, E. A. Etiologia. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto.** vol. 5, n. 2, p. 24-26, 2006

CREMONESI L., BELLONI E., MAGNANI C., SEIA M., FERRARI M. **Multiplex PCR for rapid detection of three mutations in the cystic fibrosis gene.** PCR Methods Appl. 1(4):297-8, 1992

DALCOMO M. P; ANDRADE M. K. N; PICON P. D. **Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle.** Revista Saúde Pública, Volume 41, São Paulo, Setembro 2007.

D'AMBROSIO, Lia *et al.* New anti-tuberculosis drugs and regimens: 2015 update. **ERJ Open Research.** vol. 1, n.1, p. 1-15, 2015.

ESTEBAN, J.& MUÑOZ-EGEA, M. C. **Mycobacterium bovis and Other Uncommon Members of the Mycobacterium tuberculosis Complex.** American Society for Microbiology. Espanha, Outubro 2016.

FORRELLAND, MA; KLEPP, LI; GIOFFRÉ, A; SABIOS y GARCÍA, J; MORBIDONI, H. R; DE LA PAZ, S. M; CATALDI, A. A; BIGI, F. **Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** *Virulence*;4(1):3-66, 2013.

GeneXpert Dx System Operator Manual Book. Disponível em: https://www.ghdonline.org/uploads/Ingl%C3%A9s_rev_c_version_4_gx_dx_operator_manual_jun12.pdf, 2012. Acesso em 12/08/2018.

GOODFELLOW, Michael. & MAGEEM, John. Taxonomy of mycobacteria. In; **Mycobacteria. Basic Aspect.** JENKINS, Anthony. & GANGADHARAM, Patissapu. R. J. (editores). London: Chapman and Hall, p. 1-71, 1998.

JAVED, H; BAKULA, Z; PLEN, M; HASHIMI, H.J; TAHIR, Z; JAMIL, N. & JAGIELSKI, T. **Evaluation of Genotype MTBDRplus and MTBDRsl Assays for Rapid Detection of Drug Resistance in Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Pakistan.** *Frontiers in Microbiology*. Vol. 9, article 2265. 2018.

LEIBA J, CARRÈRE-KREMER S, BLONDIAUX N, DIMALA MM, WOHLKÖNIG A, BAULARD A, KREMER L, MOLLE V. **The *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional repressor EthR is negatively regulated by Serine/Threonine phosphorylation.** *Biochem Biophys Res Commun*. 446(4):1132-8, 2014

LEVINSON, Warren. **Microbiologia Médica e Imunologia.** 10ª ed. Artmed, Porto Alegre, p. 167-174, 2010.

LIMA, T.M; BELOTTI, N.C.U; NARDI, S.M.T; PEDRO, H.S.P. **Teste Rápido Molecular GeneXpert MTB/RIF para Diagnóstico da Tuberculose.** *Pan-Amaz Saude revista* – Vol. 8, nº 2; 2017.

MGIT™ **Procedure Manual For BACTEC™ MGIT 960™ TB System.** Disponível em: https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf Acesso em 01/10/2018

MINISTÉRIO DA SAÚDE – Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (DGITS/SCTIE). Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) – **Proposta de incorporação do XPERT MTB/RIF como teste para diagnóstico de Tuberculose e para indicação de resistência à Rifampicina** – Relatório nº 49, 2013.

MOKROUSOV I, NARVSKAYA O, LIMESCHENKO E, OTTEN T, VYSHNEVSKIY B. **Detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by multiplex allele-specific PCR assay targeting embB306 mutations.** J Clin Microbiol. 40(5):1617-20, 2002

MOKROUSOV I, OTTEN T, FILIPENKO M, VYAZOVAYA A, CHRAPOV E, LIMESCHENKO E, STEKLOVA L, VYSHNEVSKIY B, NARVSKAYA O. **Detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting katG codon 315 variation.** J Clin Microbiol. 40(7):2509-12, 2002.

MOKROUSOV I, OTTEN T, VYSHNEVSKIY B, NARVSKAYA O. **Allele-specific rpoB PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears.** Antimicrob Agents Chemother. 47(7):2231-5, 2003

MOKROUSOV, I; OTTEN, T; MANICHEVA, O; POTAPOVA, Y; VISHNEVSKY, B; NARVSKAYA, O; RASTOGI N. **Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia.** Antimicrob Agents Chemother. 52 (8): 2937-9, 2008

NHU N. T. Q; HEEMSKERK D; THU D. D. A; CHAU T. T. H; MAI N. T. H; NGHIA H. D. T; LOC P. P; HA D. T. M; MERSON L; THINH T. T. V; DAY J; CHAU N. V; WOLBERS M; FARRAR J; CAWSA M. **Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for Diagnosis of Tuberculous Meningitis.** Journal of Clinical Microbiology, Volume 52, p. 226 – 233, 2014.

ROSSETTI, M. L. R.; VALIMB, A. R. M; SILVA, M. S. N. *et al.* **Tuberculose resistente: revisão molecular.** Revista Saúde Pública; v. 36, n.4, p. 525-532, 2002.

SIDDIQI, S.H. & Rüsç-Gerdes, S. MGIT™ Procedure Manual For BACTEC™ MGIT 960™ TB System. FIND. 2006. Disponível em: http://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf, Acesso em 10 de Maio de 2016.

SMITH T, Wolff KA, Nguyen L. **Molecular biology of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** Curr Top Microbiol Immunol, 2013.

VILCHÈZE C. & JACOBS JR, WR. **Resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: genes, mutations, and causalities.** Microbiol. Spectr. Vol. 2, n. 4, p. 1-21, 2014.

WHO, World Health Organization, 2006. **The Stop TB Strategy. Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals.** Disponível em: www.who.int/tb/publications/2006/stop_tb_strategy.pdf. Acesso em 14 de abril de 2018.

WHO, World Health Organization. 2015. **Global tuberculosis report.** Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf. Acesso em 14 de abril de 2018.

WHO, World Health Organization. 2017. **Global Tuberculosis Report 2017.** Disponível em: Acesso em 14 de abril de 2018.

WHO, World Health Organization. 2018. **Tuberculosis.** Disponível em: <http://www.who.int/tb/en/>. Acesso em 14 de abril de 2018.