



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

CAROLINY SOARES SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis*
MULTIDROGA RESISTENTE EM UNIDADE DE REFERÊNCIA NO MUNICÍPIO
DE FORTALEZA, CEARÁ**

**FORTALEZA
2018**

CAROLINY SOARES SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis*
MULTIDROGA RESISTENTE EM UNIDADE DE REFERÊNCIA NO MUNICÍPIO
DE FORTALEZA, CEARÁ**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para a obtenção do
Título de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota.
Coorientador: Thales Alves Campelo.

**FORTALEZA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S579c Silva, Caroliny Soares.
Caracterização molecular de isolados de Mycobacterium tuberculosis multidroga resistente em unidade de referência no município de Fortaleza, Ceará / Caroliny Soares Silva. – 2018.
50 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota.
Coorientação: Prof. Thales Alves Campelo.

1. Comorbidade. 2. Tuberculose. 3. Tuberculose resistente. I. Título.

CDD 570

CAROLINY SOARES SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis*
MULTIDROGA RESISTENTE EM UNIDADE DE REFERÊNCIA NO MUNICÍPIO
DE FORTALEZA, CEARÁ**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para a obtenção do
Título de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota
Coorientador: Thales Alves Campelo.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Delaide Sampaio Dias
Hospital de Messejana Dr. Carlos Alberto Studart Gomes

Ma. Maísa Viana de Holanda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento é a Deus, por toda a sua bondade e ajuda que me foi concedida.

Aos meus pais, Dora Ineide Soares (mãe) e Rogério Silva (pai) por todo o amor, carinho, compreensão, apoio e principalmente por nunca desistirem de mim. Obrigada por todas as conversas e brincadeiras que me ajudaram a ser o que sou hoje. Não existem palavras que expressem a gratidão que sinto.

Agradeço também ao meu irmão Gabriel, por ser o meu melhor amigo em todas as horas. Por ficar acordado me assistindo estudar e por nunca me deixar só. Te amo. Espero que um dia eu seja uma pessoa tão genial como você.

Agradeço a minha orientadora Cristiane Cunha pela oportunidade, por toda a paciência, pelos conselhos e por todos os ensinamentos nesses três anos e meio. Sempre serei grata pela oportunidade de trabalhar com a senhora.

A banca examinadora, Dra. Delaide Sampaio Dias e Maísa Viana de Holanda pela participação na defesa desse trabalho e também pelas sugestões e correções.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico por ter me oferecido uma bolsa no Programa de Iniciação Científica, que me ajudou durante a minha formação profissional.

Aos meus colegas do Laboratório de Micobactérias: Lucas, Susy, Paulo Rafael, Matheus, Claudio, Socorro, Thales Candido e Thales Campelo, por todo o companheirismo e amizade que pude construir com cada um de vocês.

Aos colegas da Mata Branca Jr, por todo o apoio e amizade. Agradeço imensamente pela oportunidade de trabalhar com cada um de vocês.

As minhas meninas: Gabriela Valentim, que me acompanhou em toda essa jornada, sempre me motivando com o seu amor, carinho, (muita) paciência e acreditando em mim, quando nem eu mesma acreditava. Te amo com todo o meu coração. Bruna Jennifer, por todas as horas perdidas te esperando jogar *Candy Crush*, por toda raiva que você já me fez e pela amizade desde o primeiro dia. Não me vejo seguindo uma vida sem você, então sempre me pede vidas que te mando. Bianca por toda a sua seriedade nas horas certas e carinho em horas inesperadas. Obrigada por toda a ajuda em cada uma das disciplinas que sofremos juntas. A Renata, por ser um amorzinho. Obrigada pelas risadas, pelas danças e por todas as lembranças maravilhosas que levarei na vida, pois em quase todas você estará lá. Andréia, pelos abraços e

por ser meu amor. Pelas conversas enquanto estávamos deitadas na grama e por sempre me acompanhar. Enfim, amo cada uma de vocês por serem tão diferentes e maravilhosas como são. Gostaria de lembrar que Icapuí sempre espera por nós.

Ao Thiago Guerra, por todos os abraços, palavras de motivação (ou não) e por ser companheiro nas reclamações diárias. Obrigada por sempre torcer por mim. Você será um professor sensacional; Hipólito Denizard, por todo o amor, carinho e por ser meu farol. Você é uma das pessoas mais maravilhosas que já conheci. Obrigada por tudo.

A Soraya Sancho e Niédila Nascimento por toda a paciência, ensinamentos e ajuda que me foram essenciais.

A todos os meus amigos que não foram citados anteriormente, mas que me ajudaram de alguma forma, pois sem vocês nada disso teria acontecido.

Por fim, ao Lupin, por me acompanhar nas madrugadas e por estar sempre perto de mim durante todo esse processo.

RESUMO

A doença tuberculose (TB) é altamente infecciosa, causada pelo o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. É estimado que um quarto da população mundial esteja infectada. De acordo com a OMS, em 2014 foi estimado que ocorreram 480.000 casos de TB-MDR. Em 2017, foram notificados 3.076 casos de TB no Ceará, dos quais 1.847 foram notificados apenas em Fortaleza o que representa uma taxa de incidência de 63,8 casos novos por 100 mil habitantes, o que é considerado um parâmetro elevado com relação à média nacional. A TB multidroga resistente (MDR) é definida como a resistência à isoniazida (I) e rifampicina (R), dois principais fármacos utilizados no tratamento da TB, constituindo assim um problema grave para o controle da doença. O principal objetivo foi determinar e compreender as variáveis da frequência e da transmissão da TB-resistente (TB-R) relacionadas ao ambiente domiciliar e da comunidade, avaliando aspectos socioeconômicos, ambientais, comportamentais e comorbidades, associadas à TB-R. Foi realizado um estudo prospectivo e observacional com 49 participantes com TB-R em pacientes HIV negativos. A coleta do material foi realizada nos ambulatórios do Hospital Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, no período de julho de 2017 a junho de 2018. As amostras de escarro foram cultivadas e submetidas ao teste fenotípico BACTEC. Além disso, foi aplicado um questionário com dados demográficos, clínicos e comportamentais. A resistência à I e R foram encontradas em 30,6% (15/49) dos casos analisados. Em relação a diabetes, 67,8% (33/49) dos pacientes não apresentavam essa comorbidade. O alcoolismo aumentou o risco da resistência, onde 73,7% (14/19) dos pacientes apresentavam cepas resistentes. Em relação ao sexo, houve um predomínio de homens no total dos participantes de 53,1% (26/49). O conjunto das informações deste estudo poderão ser empregadas para estabelecer medidas mais adequadas e efetivas para a prevenção desta doença.

Palavras-chave: Comorbidade. Tuberculose. Tuberculose resistente.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) disease is highly infectious, caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. It is estimated that a quarter of the world's population is infected. According to WHO, in 2014 it was estimated that there were 480,000 cases of MDR-TB. In 2017, 3,076 TB cases were reported in Ceará, of which 1,847 were reported in Fortaleza alone, representing an incidence rate of 63.8 new cases per 100,000 inhabitants, which is considered a high parameter in relation to the national average. Resistant multidrug TB (MDR) is defined as resistance to isoniazid (I) and rifampicin (R), two main drugs used to treat TB, thus constituting a serious problem for the control of the disease. The main objective was to determine and understand the variables of frequency and transmission of resistant TB (TB-R) related to the home and community environment, evaluating socioeconomic, environmental, behavioral and comorbidities aspects associated with R-TB. A prospective and observational study was conducted with 49 participants with TB-R in HIV-negative patients. The material was collected at the outpatient clinics of Dr. Carlos Alberto Studart Gomes Hospital from July 2017 to June 2018. Sputum samples were cultured and submitted to the BACTEC phenotypic test. In addition, a questionnaire with demographic, clinical and behavioral data was applied. The I and R resistance were found in 30.6% (15/49) of the analyzed cases. Regarding diabetes, 67.8% (33/49) of the patients did not present this comorbidity. Alcoholism increased the risk of resistance, where 73.7% (14/19) of the patients had resistant strains. Regarding gender, there was a predominance of men in the total of the participants of 53.1% (26/49). All the information in this study could be used to establish more adequate and effective measures for the prevention of this disease.

Keywords: Comorbidity. Tuberculosis. Tuberculosis resistant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Visualização de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) amostras de escarro de pacientes com TB resistente	13
Figura 2 -	Colônias de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Crescimento em Lowenstein – Jensen	14
Figura 3 -	Estimativa do número de casos novos de tuberculose referente ao ano de 2016	15
Figura 4 -	Coeficiência de incidência de tuberculose no Brasil 1990-2017	16
Figura 5 -	Casos novos e incidência de tuberculose por ano de diagnóstico no Ceará, período de 2013 a 2017	17
Figura 6 -	Proporção de cura, abandono e ignorado dentre os casos novos de tuberculose no Ceará, período de 2013 a 2017	17
Figura 7 -	Preparo da separação eletroforética para detecção de resistência dos genes <i>rpoB531</i> e <i>katG315</i>	27
Figura 8 -	Eletroforese em gel de agarose 3% com produtos de amplificação do códon 531 do gene <i>rpoB</i> de <i>M. tuberculosis</i>	33
Figura 9 -	Eletroforese em gel de agarose 3% com produtos de amplificação do códon 315 do gene <i>katG</i> de <i>M. tuberculosis</i>	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Iniciadores para a amplificação da região IS6110	25
Tabela 2 -	Perfil de resistência aos fármacos utilizados no tratamento contra a tuberculose dos isolados de 49 pacientes com tuberculose pulmonar atendidos nos ambulatórios do Hospital de Messejana, Fortaleza, Ceará – Brasil	28
Tabela 3 -	Associação entre as características sociodemográficas e o perfil de resistência realizado pelo sistema BACTEC MGIT 960 dos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.....	30
Tabela 4 –	Fatores de riscos associados ao fenótipo de resistência obtido pelo sistema BACTEC MGIT 960 dos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.....	31
Tabela 5 –	Aspectos clínicos apresentado pelos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilo álcool-ácido resistentes
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
E	Etambutol
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HM	Hospital de Messejana
I	Isoniazida
LabMico	Laboratório de Micobactérias
LJ	Löwenstein-Jensen
MNT	Micobactérias não tuberculosas
MGIT	Mycobacterial Growth Indicator Tube
NB3	Nível de biossegurança 3
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-MAS	PCR- Multiplex alelo específico
PZA	Pirazinamida
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
R	Rifampicina
SINAN	Sistema de Informação de Agravos e Notificação
S	Streptomomicina
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
TE	Tampão Tris/EDTA
TB	Tuberculose
TB-DR	Tuberculose Droga Resistente
TB-MDR	Tuberculose Multidroga Resistente
TB-XDR	Tuberculose Extensivamente Resistente

TSA

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

TCLE

Termo de Consentimento Livre Esclarecido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Local de realização da pesquisa	22
3.2	Critérios de inclusão e exclusão	22
3.3	Participantes do estudo	22
3.4	Cultivo primário e teste de sensibilidade a drogas antimicrobianas	23
3.5	Cultivo secundário	23
3.6	Baciloscopia	23
3.7	Extração do DNA genômico	24
3.8	Identificação de <i>M. tuberculosis</i> pela amplificação de IS61100	25
3.9	Identificação das mutações nos genes <i>rpoB 531</i> e <i>katG 315</i>	26
3.9.1	<i>Condições para PCR-MAS rpoB-513</i>	26
3.9.2	<i>Condições PCR-MAS nos genes katG315</i>	26
3.9.3	<i>Eletroforese para a detecção dos produtos dos genes rpoB531 e katG315</i>	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Características fenotípicas das amostras isoladas	28
4.2	Características da população	29
4.3	Caracterização genômica da resistência às drogas anti-TB	32
4.3.1	<i>Gene rpoB</i>	32
4.3.2	<i>Gene katG315</i>	33
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40
	APÊNDICE	47
	ANEXO	48

1 INTRODUÇÃO

A doença tuberculose (TB) é altamente infecciosa, causada pelo o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), sendo estimado que um quarto da população mundial esteja infectada (WHO, 2017). A doença pode ser adquirida a partir da inalação de gotículas e aerossóis contendo bacilos de *M. tuberculosis* de pacientes com TB pulmonar ativa. A forma clínica pulmonar é a mais comum. Entretanto, o bacilo pode ser disseminado pela via hematogênica, linfática e/ou contiguidade tecidual, como rins, ossos, sendo denominada de tuberculose extrapulmonar (NARASIMHAN *et al.*, 2013).

Uma pequena parcela das pessoas infectadas pelo bacilo desenvolverá a doença. Entretanto, pacientes acometidos por vulnerabilidades como a infecção pelo HIV, o uso de álcool e drogas ilícitas, apresentarão uma maior probabilidade de desenvolver a doença (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012).

A TB é uma das doenças mais antigas que ainda causam problemas ao homem. Apesar de todos os avanços nas pesquisas, continua sendo a doença infecciosa que mais causa óbito no mundo. Infelizmente, a situação tende a se agravar devido ao aparecimento de isolados de Mtb multidroga-resistentes (TB-MDR) ou extensivamente droga resistentes (TB-XDR).

Com todos esses agravantes, diversas áreas de estudo voltaram a buscar novas ferramentas e estratégias, como estudos epidemiológicos e interação do agente patogênico com o hospedeiro, que ajudem a controlar e possivelmente eliminar a doença (HOFT *et al.*, 2008).

As micobactérias são bactérias Gram-positivas e aeróbias, pertencendo ao gênero *Mycobacterium*, este qual pertence ao Reino Monera, classe das Actinobactérias, ordem Actinomycetales e da família Mycobacteriaceae (EUZÉBY, 2017).

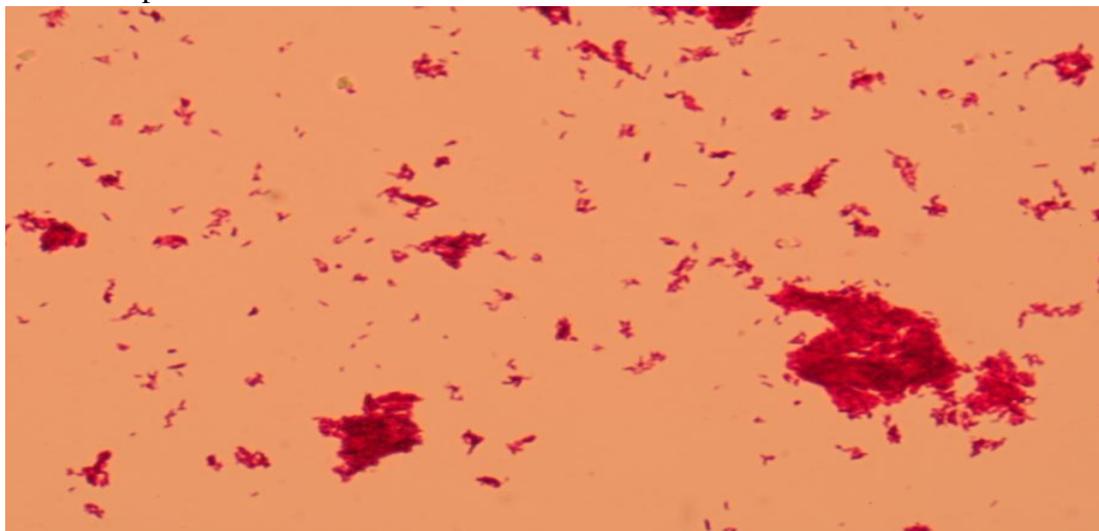
O gênero é composto por 169 espécies. Estas espécies são divididas em três grupos principais: o Complexo *M. tuberculosis* (CMTB), o *Mycobacterium leprae* e um grupo de bactérias referidas como micobactérias não-tuberculosas (MNT), como as espécies *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium abscessus* (JAGIELSKI *et al.*, 2016).

As micobactérias também podem ser divididas de acordo com suas características de crescimento em condições ótimas, sendo divididas em espécies de crescimento lento e rápido. As de crescimento lento, como *M. tuberculosis*, apresentam tempo de geração de aproximadamente de 20 h e requerem mais de sete dias para formarem colônias. As micobactérias de crescimento rápido possuem o seu tempo de geração em cerca de 3 a 5 h e apresentam colônias em menos de sete dias (PFYFFER; PALICOVA, 2015).

As micobactérias possuem um alto teor genômico de ligações Guanina-Citosina em seu DNA, cerca de 61 a 71% que possuem ácido micólico, como um dos principais componentes da parede celular e resistem à descoloração com uma solução álcool-ácida, sendo denominados de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (OLIVEIRA, 2013). A parede celular deste microrganismo é semelhante a parede de uma bactéria Gram-positiva, contendo uma camada polipeptídica, uma camada de peptidoglicano e lipídeos. O elevado teor de lipídico é responsável por tornar essa parede hidrofóbica, com baixíssima permeabilidade aos fármacos e detergentes. Além disso, conferem características de BAAR (HOFFMANN *et al.*, 2008). A coloração é realizada pelo uso da técnica de Ziehl-Neelsen, que comprova a sua propriedade de álcool-ácido resistência (FIGURA 1; CATTOIR, 2004).

Além disso, são caracterizadas por serem bacilos retos ou ligeiramente curvos, medindo aproximadamente de 0,2 a 0,6 μm de espessura por 1,0 a 10 μm de comprimento, não formadores de esporos, sem motilidade e não apresentam cápsula (CANTÓN, 2005).

Figura 1 - Visualização de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) de amostras de escarro de pacientes com TB resistente.



Fonte: Própria autora (2018). Coloração de Ziehl-Neelsen. Microscopia óptica (Microscópio Zeiss), aumento de 1000x.

O complexo *M. tuberculosis* (CMTB) agrupa um conjunto de bactérias que pertencem ao gênero *Mycobacterium*, sendo a espécie *M. tuberculosis* a espécie de maior importância para o homem por ser um dos principais causadores de infecções em humanos. Os representantes do complexo são: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* (BROSCH *et al.*, 2002), *M. caprae* (ARANAZ *et al.*, 2003), *M. canetti* (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1997), *M. mungi* (ALEXANDER *et al.*, 2010), *M. orygis* (VAN INGEN *et al.*, 2012) e *M. pinnipedii* (COUSINS *et al.*, 2003).

A TB é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *M. tuberculosis*, sendo este um parasita intracelular facultativo, que sobrevive dentro das células do sistema fagocítico mononuclear e possui um crescimento lento. Foi descrita pela primeira vez por Robert Koch, em 1882, sendo denominada assim de “bacilo de Koch” (KAUFMANN; SCHAIBLE, 2005).

Os bacilos apresentam as características gerais do gênero, como a forma de bacilos finos e ligeiramente encurvados. O meio de cultura Löwenstein-Jensen (LJ) é o mais utilizado para os isolamentos desta micobactéria. Esse meio se caracteriza por ser um meio sólido que possui ovo em sua composição, juntamente com glicerol e asparagina. As colônias aparecem com aspecto rugoso e com a cor de camurça (FIGURA 2).

Figura 2 - Colônias de *Mycobacterium tuberculosis*. em meio Löwenstein - Jensen.



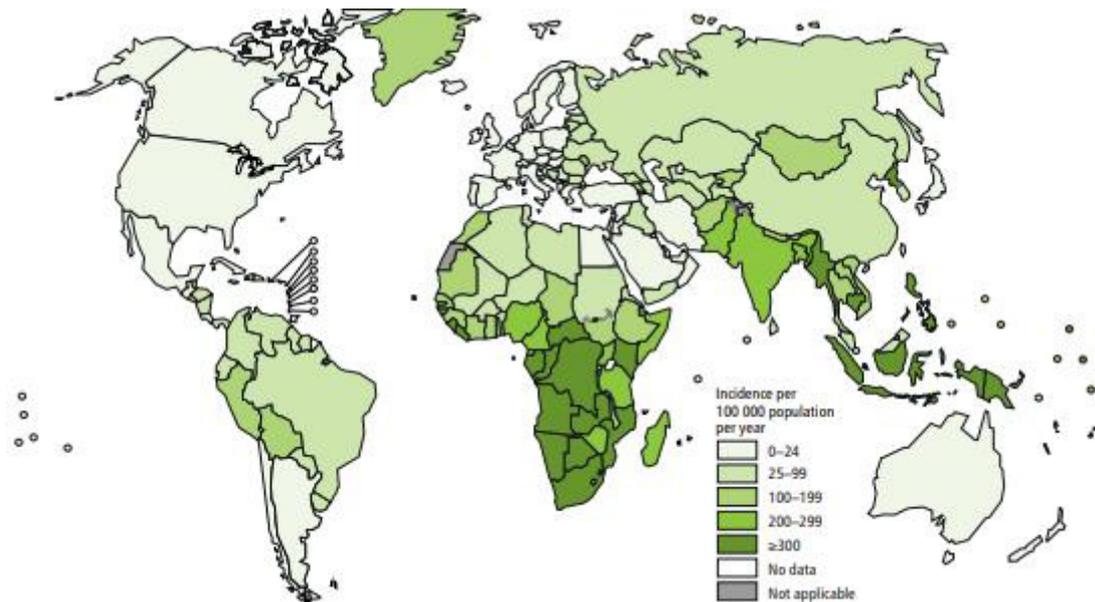
Fonte: Fernandes (2018).

O genoma de *M. tuberculosis* é um dos maiores dentre todas as bactérias, se destacando uma elevada quantidade de bases nitrogenadas citosina e guanina (C-G) com um teor de 65,6%, codificando aproximadamente 4.000 proteínas, rico em sequências de inserções repetitivas, onde a IS6110 é a mais comum, por apresentar 16 cópias no genoma, sendo utilizada como uma ferramenta determinante para diferenciação de isolados de *M. tuberculosis* e *M.bovis* (COLE *et al*, 1998; FORRELLAD *et al.*, 2013).

De acordo com a OMS, a TB acomete cerca de 10 milhões de pessoas a cada ano e é considerada uma das 10 principais causas de morte em todo o mundo. Em 2016, foi estimado que 10,4 milhões de casos de TB, o que é equivalente a 140 casos para cada 100 mil habitantes. Além disso, em 2016, foi estimado 1,3 milhões de mortes de pacientes HIV-negativos por TB e 374.000 mortes de pacientes HIV-positivos. Sabe-se que a Ásia é um grande reservatório de

TB no mundo, onde foi estimado que 45% dos casos detectados em 2016 ocorreram nessa região. Além dessa região, África, América Central e América do Sul também apresentam elevada prevalência da doença (FIGURA 3; WHO, 2017).

Figura 3 - Estimativa do número de casos novos de tuberculose referente ao ano de 2016.

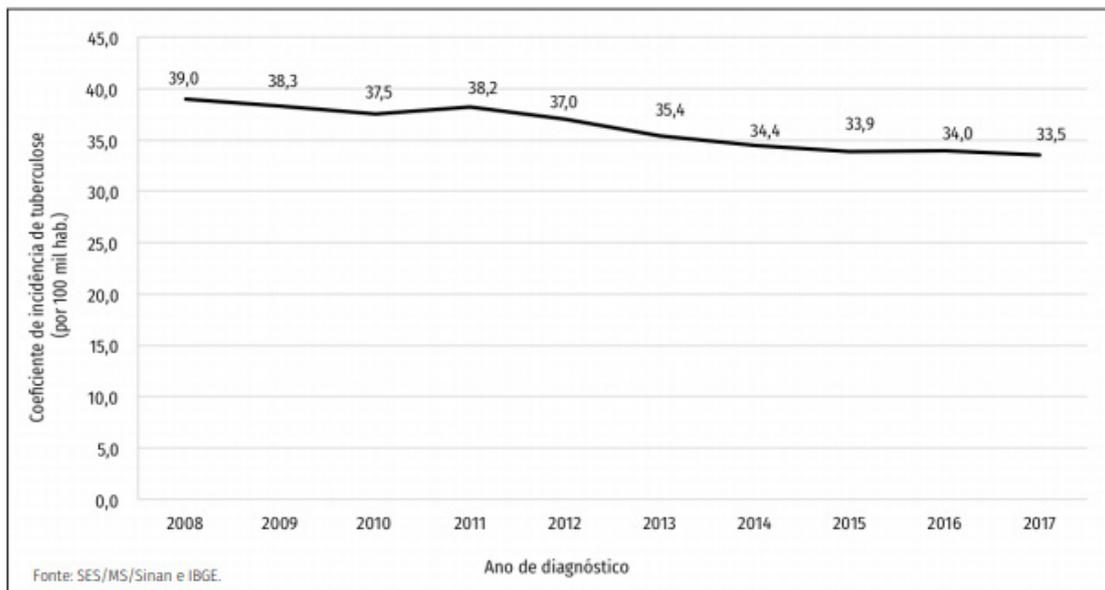


Fonte: WHO (2017).

O Brasil ocupa a 20ª posição quanto a carga da doença. As regiões Norte, Nordeste e Sudeste apresentam as maiores taxas de detecção e mortalidade (BRASIL, 2018).

Em 2015, o país reduziu a sua incidência em 20,4%, com 70 mil casos novos de TB com uma proporção de 30,9 casos para cada 100 mil habitantes. Em 2016, foram registrados 66.796 casos novos, sendo que 840 se caracterizaram como TB-MDR (FIGURA 3; BRASIL, 2016). Em 2017, houve um aumento na incidência de TB no Brasil. Foram detectados 69.590 casos novos. Além disso, no mesmo ano ocorreram aproximadamente 4.426 mortes exclusivamente por TB (WHO, 2015; BRASIL, 2018).

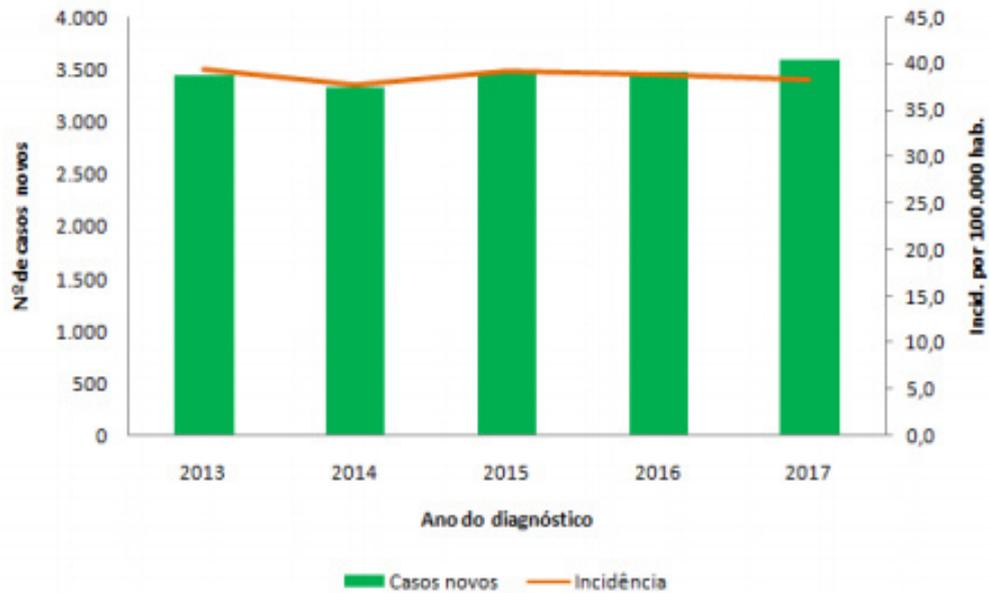
Figura 4 - Coeficiência de incidência de tuberculose no Brasil 1990-2017.



Fonte: Secretaria de Vigilância da Saúde/ Ministério da Saúde (2018).

Em 2015, de acordo com a Secretária de Saúde do Estado do Ceará, foram notificados casos em 90% dos municípios do estado, com um total de 3.417 casos novos, representando uma incidência de 38,4/100 mil habitantes. Já em 2017, houve um declínio na quantidade de casos novos, onde foram notificados 3.076 casos de TB no Ceará, dos quais 1.847 foram notificados apenas em Fortaleza, o que representa uma taxa de incidência de 63,8 casos novos por 100 mil habitantes, que mesmo assim é considerado um parâmetro elevado com relação à média nacional (FIGURA 5; CEARÁ, 2018).

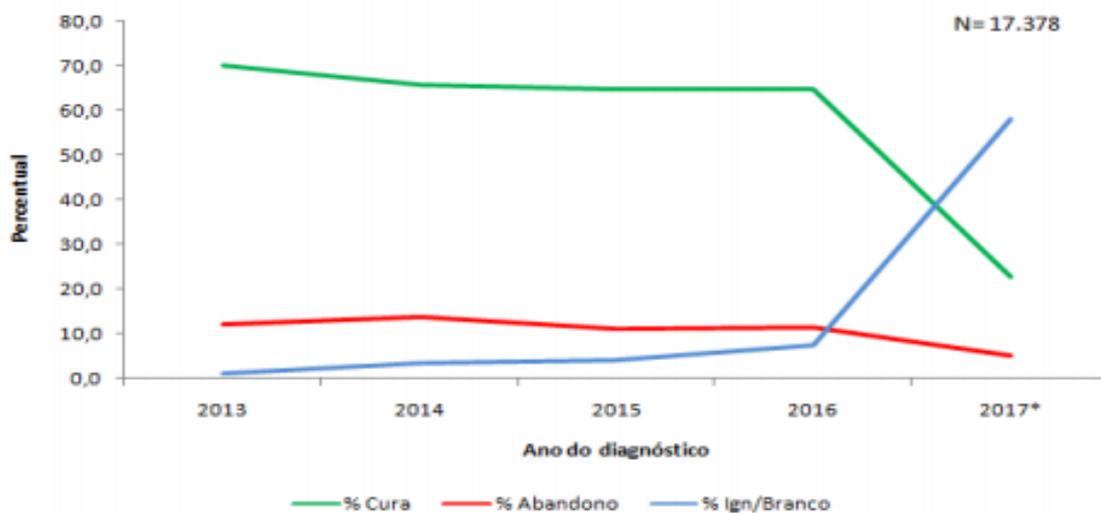
Figura 5 - Casos novos e incidência de tuberculose por ano de diagnóstico no Ceará, período de 2013 a 2017.



Fonte: SESA/COPROM/NUVEP – Sinan (CEARÁ, 2018).

No ano de 2017, houve um percentual de 11% de abandono de tratamento no estado do Ceará (FIGURA 6). A cidade de Fortaleza se destaca com a maior taxa de abandono com 15%, se tornando a segunda capital do Nordeste com o maior número de abandono de tratamento (CEARÁ, 2018).

Figura 6 - Proporção de cura, abandono e ignorado dentre os casos novos de tuberculose no Ceará, período de 2013 a 2017.



Fonte: SESA/COPROM/NUVEP – Sinan

A TB é uma doença tratável que utiliza uma combinação de fármacos antimicobacterianos que são fornecidos e supervisionados ao paciente por um profissional de saúde. A TB pode ser curada na maioria dos casos e evita a resistência, contudo, o sucesso do tratamento depende se o indivíduo utilizar os medicamentos de forma correta, com total atenção as doses e ao tempo correto do tratamento (OLIVEIRA, 2013).

Como citado anteriormente, a TB é tratada por uma combinação de medicamentos, incluindo a isoniazida (I), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E) e estreptomicina (S). Estes fármacos constituem como sendo de primeira linha no tratamento. A I atua diretamente inibindo a síntese do ácido micólico, enquanto o E agirá como inibidor da formação do arabinogalactano, moléculas que estão diretamente ligadas a camada lipídica da parede. A R atua na inibição da síntese de mRNA, evitando a transcrição gênica. A Z é um pró-fármaco, é convertida em ácido pirazinóico pela enzima bacteriana pirazinamida, que promove acidificação da micobactéria e morte do bacilo (LABORCLIN, 2011; SUTRE, 2010; OLIVEIRA, 2013; LIMA *et al*, 2011).

De acordo com a OMS, o esquema terapêutico recomendado no tratamento da TB deve ter uma duração mínima de 6 meses e no máximo de 12 meses, sendo dividido em duas fases: a fase intensiva e a fase de manutenção (BRASIL, 2011).

A fase intensiva consiste em um tratamento por dois meses utilizando a I, R, Z e E, visando reduzir a transmissão. A fase de manutenção deve durar quatro, sete ou dez meses e possui o objetivo de eliminar os bacilos, prevenindo um possível retorno da doença (BRASIL, 2011).

Em caso de resistência aos fármacos de primeira linha, protocolos alternativos são utilizados com fármacos de segunda linha, sendo que este tratamento pode durar por até um ano. São utilizados os seguintes fármacos da classe das fluoroquinolonas: levofloxacina, moxifloxacina e ofloxacina; e fármacos injetáveis da classe dos aminoglicosídeos (amicacina, canamicina e capreomicina). Os fármacos de segunda linha apresentam algumas desvantagens por serem menos eficazes e provocam efeitos mais adversos no paciente (SUTRE, 2010; BRASIL, 2011; DUARTE *et al*, 2007).

Os efeitos adversos causados pela terapia são comuns. Em decorrência disso, alguns pacientes interrompem o tratamento antes do tempo recomendado do esquema terapêutico. Este é um dos fatores mais preocupantes, pois o não cumprimento do esquema de tratamento, em parcial ou total, pode propiciar o surgimento de isolado resistente aos fármacos antimicobacterianos (OLIVEIRA, 2013). No Brasil sabe-se que 96% dos casos de

multirresistência são associados aos tratamentos realizados de forma irregular (SIQUEIRA, 2009), no Ceará a taxa de abandono em 2016 foi de 11,4% (CEARÁ, 2018).

A resistência aos fármacos mediada por plasmídeos é incomum em micobactérias, sendo relatada a presença destes elementos móveis em algumas espécies ambientais, como *M. abscessus* (MATSUMOTO *et al.*, 2014) e *M. fortuitum* (HULL *et al.*, 1984). Em *M. tuberculosis* a resistência é atribuída a mutações cromossômicas. Os principais mecanismos envolvidos na resistência são: alteração do alvo do antibiótico (Ex.: mutação no gene *rpoB*), expressão aumentada do alvo (Ex.: mutação na região promotora do *mabA*), inibição da ativação da pró-droga (Ex.: mutação do gene *pncA*) e ativação de bomba de efluxo (Ex.: resistência a fluoroquinolonas, mutações nos genes *lfrA* e *pstB*) (ZHANG; YEW, 2015).

A resistência às duas principais drogas de primeira linha utilizadas no tratamento, I e R, caracteriza a TB multidroga resistente (TB-MDR). A TB extensivamente resistente (TB-XDR) é definida como um tipo menos comum de TB-MDR que é acrescida de resistência a fluoroquinolona e a pelo menos um dos três fármacos de segunda linha injetáveis (amicacina, canamicina ou capreomicina) (GANDHI *et al.*, 2006).

A resistência à R ocorre devido a mutações sucessivas e espontâneas que ocorrem no gene *rpoB* que codifica a subunidade Beta da RNA polimerase. Cerca de 96% dos isolados resistentes à R possuem mutações em uma região definida de 81 pares de base (pb), sendo as mutações mais frequentes nos códonos 531, 526 e 516 (SUTRE, 2010; UNISSA *et al.*, 2016).

O mecanismo responsável pela resistência à I tem sido atribuído a mutações individuais em inúmeros genes. Diversos estudos demonstram que são devidas principalmente a mutações no gene *katG* o qual é responsável pela síntese da catalase-peroxidase. A mutação no códon 315 do gene *katG* é a mais comum, sendo responsável por 50-95% das mutações em isolados resistentes (ZHANG; YEW, 2015). Outro gene bastante envolvido nesta resistência é o *inhA* que está associado na síntese do ácido micólico (KALOKHE *et al.*, 2014).

A OMS recomenda que as seguintes estratégias sejam implementadas para eliminar a TB: diagnóstico precoce da doença, incluindo testes de sensibilidade e rastreamento sistemático dos contatos e grupos de alto risco; tratamento de todas as doentes, incluindo TB droga resistente (TB-DR) e apoio ao paciente; atividades colaborativas de TB/HIV e manejo de comorbidades; e tratamento preventivo de pessoas de alto risco e vacinação contra TB (WHO, 2018).

Desta forma, é necessário o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico precoce e rápido resultado. Portanto, os métodos moleculares têm se tornado uma ótima alternativa. Os métodos de genotipagem se mostram eficazes por serem aplicados em diversos tipos de

amostras biológicas, necessitando da combinação de três etapas: extração do DNA micobacteriano, amplificação do fragmento alvo genético para diagnóstico do *M. tuberculosis* e detecção de mutações relacionadas a resistência (SUTRE, 2010).

Em 2010, o sistema Gene Xpert™ MTB/Rif foi recomendado pela OMS para o diagnóstico de TB pulmonar e laríngea, sendo utilizado principalmente em indivíduos com suspeita de TB resistente. Esta técnica consiste em uma triagem em amostras resistentes a RIF por meio de uma nested-PCR em tempo real. Um dos principais benefícios desse teste é que os resultados saem em menos de duas horas, sem a necessidade de tratamento prévio das amostras. A desvantagem é que esta tecnologia apresenta custo elevado quanto aos reagentes e quanto a estrutura e operação da tecnologia (JANKOVIC, 2013).

A PCR multiplex alelo específico (PCR-MAS) consiste em outra alternativa diagnóstica para detecção de mutações relacionadas a resistência. Utiliza diferentes tipos de iniciadores, sendo que um dos iniciadores anela na região da mutação pontual. Este ensaio consiste em uma única PCR, onde são utilizados três pares de iniciadores alelos específicos, que produzem diferentes comprimentos de produtos amplificados. Esta técnica foi adaptada por Yang *et al* (2005) e utilizaram para detectar simultaneamente mutações associadas as resistências à I, R e E, sendo detectadas mutações nos genes *katG*, *inhA*, *rpoB* e *embB*, respectivamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar e compreender as variáveis da frequência da TB-DR relacionada às características do hospedeiro.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar variáveis socioeconômicas, ambientais, comportamentais (dados clínicos) e presença de comorbidades associadas à TB-DR no âmbito familiar;
- Caracterizar o perfil fenotípico de sensibilidade aos principais antimicrobianos dos isolados clínicos de *M. tuberculosis*;
- Analisar as mutações nos genes *rpoB* e *katG* dos isolados de TB-DR em relação a resistência fenotípica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização da pesquisa

O presente trabalho consistiu em um estudo observacional e prospectivo com a duração de 12 meses, realizado entre os meses de julho de 2017 a junho de 2018, sendo realizado nas instituições abaixo discriminadas:

- Hospital da rede da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Ceará, Hospital Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, também conhecido como Hospital de Messejana (HM, Fortaleza-CE);
- Laboratório de Pesquisa em Micobactérias do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza-CE).

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo os pacientes com TB pulmonar que foram atendidos no Hospital de Messejana com idade igual ou maior que 16 anos, que apresentaram isolamentos de *M. tuberculosis* com resistência a pelo menos um fármaco utilizado no tratamento contra a TB.

Foram excluídos do estudo os pacientes que não consentiram participação, indivíduos HIV positivos e aqueles com idade inferior a 16 anos. Também foram excluídos os pacientes com cultivo bacteriano com colônias não características de *M. tuberculosis*.

3.3 Participantes do estudo

Os pacientes com TB-DR foram convidados a participar da pesquisa aqui descrita e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Além disso, os pacientes participaram de uma entrevista com uma assistente social do HM onde responderam um questionário elaborado para os participantes do estudo, onde foram coletadas informações como: endereço residencial, características comportamentais, clínicas e laboratoriais.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, via Plataforma Brasil, sendo aprovado com o parecer número 1.956.894 (ANEXO B). No momento da entrevista com a assistente social do HM foi aplicado um questionário semiestruturado a todos os participantes do estudo. Foram coletadas informações de endereço

residencial, demográficas, socioeconômicas, comportamentais, clínicas e laboratoriais (APÊNDICE A).

3.4 Cultivo primário e teste de sensibilidade a drogas antimicrobianas

As amostras clínicas dos pacientes atendidos no ambulatório do HM com suspeita de TB pulmonar foram cultivadas no sistema BD BACTEC Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) 460TB. As amostras com cultivo positivo foram submetidas ao teste fenotípico de sensibilidade aos antimicobacterianos (TSA) aos fármacos R, I, S e E.

Os isolados bacterianos foram enviados ao Laboratório de Micobactérias (LabMico) do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Ceará, para a realização de subcultivo e a detecção molecular da resistência.

3.5 Cultivo secundário

Esta etapa foi realizada no laboratório de cultivo de micobactérias (NB3) em cabine de segurança biológica tipo IIb Purifier Class II Total Exhaust (Labconco). Durante o processo foram utilizadas as medidas de biossegurança recomendadas, como o uso de máscara com filtro N-95, luvas, aventais e touca. Os isolados de *M. tuberculosis* foram subcultivados em meio Löwenstein-Jensen e incubados a 37°C por 14 a 21 dias.

3.6 Baciloscopia

As culturas que apresentavam crescimento visível e estavam em fase de crescimento exponencial, foram submetidas a coloração de Ziehl-Neelsen, para a confirmação como BAAR.

Para a realização desta técnica, as amostras foram colocadas em lâminas e cobertas por fucsina fenicada e foram fixadas com o auxílio de um bico de Bunsen até a emissão de calor. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água corrente e cobertas com uma solução álcool-ácido para que o esfregado fosse totalmente descorado. Por fim, as lâminas foram lavadas com água corrente e foram cobertas com o corante azul de metileno, por 30 segundos. A visualização foi realizada em microscópio óptico Zeiss, modelo Axio Scope, em objetiva de imersão (aumento de 1000×).

3.7 Extração do DNA genômico

Antes do início da extração, foi realizada limpeza da cabine de segurança biológica utilizando uma solução de glutaraldeído 2%, seguido de emissão de luz ultravioleta por 20 minutos.

A extração seguiu o protocolo publicado por Parish e Stoker (2001). O crescimento bacteriano observado em meio LJ, foi retirado com o auxílio de uma alça estéril e colocado num microtubo tipo *Eppendorf*[®] contendo 500 µL de Tampão TE (0,01M Tris-HCl e 0,001 EDTA [pH 8]), sendo posteriormente centrifugado por 15 minutos a 2500 rpm. Após esta etapa, as células foram ressuspensas com o auxílio de uma pipeta e o tubo foi selado com uma película flexível (Parafilm[®]) e aquecido em banho-maria entre 80° e 100°C por 20 minutos, para promover a inativação celular.

Ao final desta etapa, foi aguardado o resfriamento da suspensão e foram adicionados 10 µL de lisozima (concentração final de 1 mg/mL) e 10 µL de RNase 10 mg/mL. A homogeneização ocorreu por lenta e gentil inversão. O tubo foi incubado a 37°C por uma hora. Depois foi adicionado 150µL de proteinase K (concentração de 10mg/mL) e 30 µL de SDS 20% e em seguida foi homogeneizado novamente por lenta e gentil inversão e incubado a 45°C por 2 horas. Foi adicionado ao extrato de DNA o mesmo volume de mistura fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e misturado gentilmente ~5 vezes por inversão e centrifugado à 6000 rpm (temperatura ambiente) por 10 minutos. A fase superior aquosa, contendo o DNA, foi coletada e adicionada o mesmo volume de clorofórmio, sendo misturada gentilmente por inversão, em seguida centrifugada a 6.000 rpm por 10 minutos (temperatura ambiente) e finalmente foi coletada a fase superior aquosa.

Ao extrato de DNA foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3M e adicionado igual volume de isopropanol. Em seguida foi homogeneizado por lenta e gentil inversão (2-4 vezes), até formação de 'nuvem' de DNA. Caso não houvesse visualização do DNA, o extrato foi incubado a -20°C por 30 min e depois centrifugado a 6.000 rpm por 20 min. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% a 4 °C. Em seguida centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado tendo cuidado para não tocar no sedimento. O resíduo de etanol foi então deixado evaporar a temperatura ambiente ou 55 °C por no máximo 30 min e depois o sedimento de DNA foi solubilizado em 200 µL de TE ou outro volume menor. A suspensão foi incubada a 65°C durante 18 horas ("overnight"), sendo o DNA estocado à temperatura de -20°C. A concentração de DNA das amostras foi medida em nanoespectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) na absorbância de 260 nm.

3.8 Identificação de *M. tuberculosis* pela amplificação de IS61100

A identificação do complexo *M. tuberculosis* foi baseada na amplificação do gene *Rv2168c* que codifica a transposase IS6110 (TABELA 1; MCEVOY *et al.*, 2007).

A reação de amplificação foi realizada utilizando 1 µl de DNA genômico na concentração de 20 ng/µl, juntamente com 1 µl dos iniciadores IS6110 up e IS6110 low, ambos na concentração 25 pmol/µl, 12,5 µl de Hot Green Master Mix 2x e 9,5 µl de H₂O ultrapura, completando um volume final de 25 µl. O controle positivo foi composto por 1 µl de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv na concentração de 20 ng/µl.

Tabela 1 - Iniciadores para a amplificação da região IS6110

Iniciadores	Sequência
IS6110 up	5' - GAG CGG GCG GTG CGG ATG GTC - 3'
IS6110 low	5' - TCA GCG GAT TCT TCG GTC GTG GTC - 3'

Fonte: Frota (2015).

A amplificação foi realizada no Termociclador Mastercicler Personal- (Eppendorf) e envolveu a desnaturação inicial das fitas de DNA por 2 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 63,4°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 15 minutos. Após o término, as amostras foram mantidas a 4°C no termociclador e armazenadas a -20°C. O produto obtido foi de 179 pb.

Para a confirmação da amplificação os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%. Foram colocados 2 µl dos produtos de PCR foram misturados a 2 µl de tampão e aplicados em gel de agarose preparado com TBE 1x contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100pb (Promega) para comparação do tamanho das bandas. A eletroforese foi desenvolvida a 90V no Eletrophoresis Power Supply EPS 300 (GE Healthcare) e as bandas foram digitalizadas em Imagequant 300 (GE Healthcare).

3.9 Identificação das mutações nos genes *rpoB* 531 e *katG* 315

A técnica aqui descrita de PCR-MAS foi baseada nos protocolos de VADWAI *et al.* (2012), KUMARIA *et al.* (2017) e SIU *et al.* (2010).

3.9.1 Condições para PCR-MAS *rpoB*-513

As amplificações ocorreram de acordo com o descrito por Vadwai *et al.* (2012). Para amplificação da R: 0,125 µl do iniciador *rpoBF* (20 pmol), 0,5 µl do iniciador *rpoBR* (20 pmol), 2,5 µl do iniciador *rpoB531Fy* (20 pmol), 1 µl de DNA (20 ng/µl), 12,5 µl de Go Taq G2 Green Master Mix 2×, 1,25µl de DMSO e 7 µl de água. As condições da reação foram 94°C por 15 min, seguido de 25 ciclos a 94°C por 1 min, 72°C por 1min e 72°C por 1 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 65°C por 1 min e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10min. Como controle positivo foi utilizado 1µl de DNA (20 ng/µl) de *M. tuberculosis* H37Rv.

3.9.2 Condições PCR-MAS nos genes *katG*315

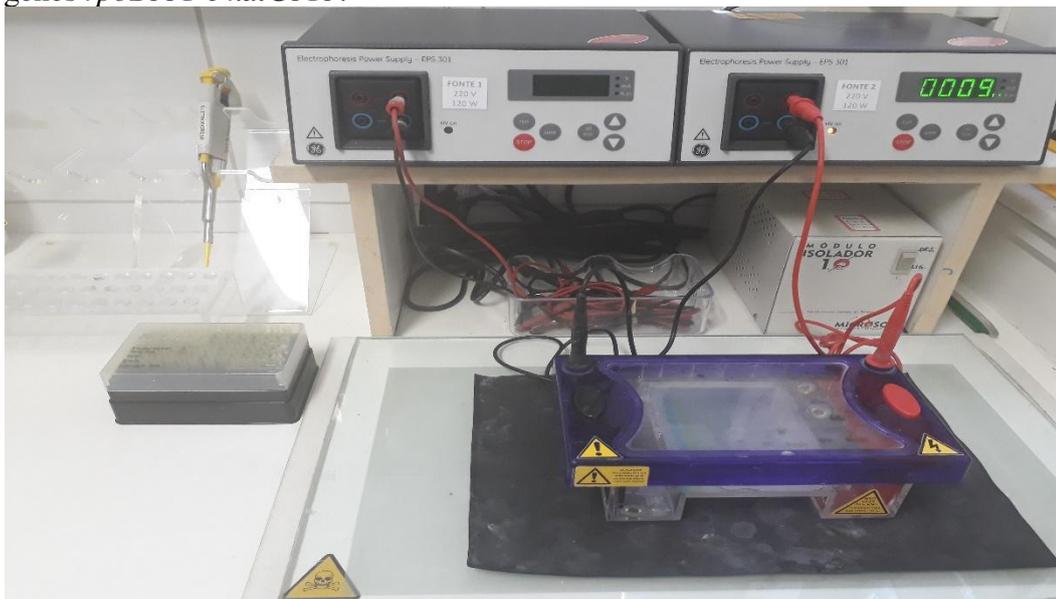
O estudo das mutações para I teve como base SIU *et al.* (2010). Para amplificação do códon *katG*-315: 0,6 µl do iniciador *katG315_0Fx* (20 pmol), 0,8 µl do iniciador *katG315_4Rx* (20 pmol), 0,6 µl do iniciador *katg315_5Rx* (20 pmol), 2,5 µl de DNA (20 ng/µl), 12,5 µl de Go Taq G2 Green Master Mix e 8,0 µl de água. As condições da reação foram 96°C por 8 min, seguido de 6 ciclos de 95°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 30 seg, 6 ciclos de 95°C por 1 min, 70°C por 40 seg e 72°C por 30 seg, 25 ciclos de 94°C por 1 min, 68°C por 30 seg e 72°C por 30 seg e extensão final a 72°C por 10 min. Como controle positivo foi utilizado 2,5 µl de DNA (20 ng/µl) de *M. tuberculosis* H37Rv.

3.9.3 Eletroforese para a detecção dos produtos dos genes *rpoB*531 e *katG*315

Os produtos foram separados por eletroforese na fonte voltaica “Eletrophoresis Power Supply” - EPS 300 (GE Healthcare) em gel de agarose a 3 % em tampão TBE 1× (tris base 1 mM, ácido bórico 0,9 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e coloração com 0,5 µl de brometo de etídio 10 mg/ml. Os géis foram preparados em bandejas eletroforéticas de 12 por 8 cm de tamanho. As corridas ocorreram a 90 volts por 40 a 55 minutos. As amostras foram aliqüotadas nos poços dos géis, sempre em ordem padronizada dos iniciadores, ficando por último os

controles negativos, sendo colocado em cada poço do gel 10 μ l de cada produto de PCR-mix correspondente da placa. No primeiro poço e último poço foram carregados 6 μ l do marcador de DNA de peso molecular de 100pb (Promega). Os fragmentos foram ao final visualizados e digitalizados no sistema “ImageQuant” 300 (GE Healthcare).

Figura 07 - Preparo da separação eletroforética para detecção de resistência dos genes *rpoB531* e *katG315*.



Fonte: Própria autora (2018)

4. RESULTADOS

4.1 Características fenotípicas das amostras isoladas

No período de março de 2017 a fevereiro de 2018, foram reportados no laboratório do HM 56 amostras com cultura positiva e perfil fenotípico de resistência equivalente aos fármacos utilizados no tratamento contra a TB, detectadas pelo sistema BD BACTEC MGIT 460TB. Deste total de amostras foram excluídas sete, cinco por apresentarem resultado positivo para HIV e duas por contaminação.

Das 49 amostras de *M. tuberculosis* incluídas nesse estudo, 24,5% (12/49) apresentaram resistência a um fármaco, onde 14,2% (7/49) apresentavam resistência a I e 8,2% (4/49) resistência a R. A resistência até dois fármacos foi encontrada em 36,6% (18/49) das amostras, sendo a resistência tipo TB-MDR, a I e R, a mais frequente com 30,6% (15/49). A resistência a três ou mais fármacos foi encontrada em 38,8% (19/49), sendo encontrada resistência simultânea R, I, S e E em 22,4% (11/49) (TABELA 2).

Tabela 2 - Perfil de resistência aos fármacos utilizados no tratamento contra a tuberculose dos isolados de 49 pacientes com tuberculose pulmonar atendidos nos ambulatórios do Hospital de Messejana, Fortaleza, Ceará - Brasil.

Perfil de resistência	<i>M. tuberculosis</i> (N)	(%)
1 fármaco	12	(24,5)
S	1	(2,1)
R	4	(8,2)
I	7	(14,3)
2 fármacos	18	(36,7)
I + E	1	(2,0)
I + S	2	(4,1)
I + R	15	(30,6)
≥ 3 fármacos	19	(38,8)
R + I + S	8	(16,3)
R + I + E + S	11	(22,4)
Total	49	(100)

Fonte: Própria autora (2018). I - isoniaziada, R – rifampicina, S – estreptomicina e E - etambutol.

4.2 Características da população

O estudo aqui descrito contou com 49 pacientes onde foi analisada a resistência aos fármacos I e R. Analisando as características sociodemográficas a idade média de todos os indivíduos foi de 40,9 anos, sendo que os indivíduos que apresentaram resistência a dois ou menos fármacos e três ou mais fármacos apresentaram idade média semelhante de 40,2 anos, e 40,9 anos (TABELA 3).

Em relação ao sexo, 53,6% (26/49) do total dos participantes eram homens. Entretanto, houve um predomínio de mulheres entre os indivíduos com resistência a três ou mais fármacos, de 57,8% (11/19). Não houve diferença em relação ao sexo na frequência entre os participantes com resistência a dois ou menos fármacos (TABELA 3).

A respeito do nível de escolaridade dos participantes, houve um predomínio de indivíduos que possuíam mais de 4 anos de estudo (66,4%, 32/49). Não houve diferença no grau de escolaridade entre os participantes com resistência a dois ou menos fármacos e a três ou mais fármacos. Com relação à ocupação, 77,5% (38/49) dos pacientes eram desempregados, onde os pacientes com cepas resistentes a três ou mais fármacos apresentaram uma frequência maior de desempregados em relação ao grupo de participantes com resistência a dois ou menos fármacos, 73,3% (22/30) e 84,2% (16/19) respectivamente e $p=0,0002$. Além disso, maioria dos participantes do estudo, 77,5% (38/49) dos indivíduos relataram que eram procedentes de Fortaleza.

Tabela 3 - Associação entre as características sociodemográficas e o perfil de resistência realizado pelo sistema BACTEC MGIT 960 dos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.

	Total		≥ 3 fármacos		< 2 fármacos		p ^a
	49	(%)	19	(%)	30	(%)	
Idade (anos)							
Média (± DP)	40,4	(±11,2)	40,9	(±12,1)	40,2	(±10,9)	
< 30	9	(19,5)	3	(±15,7)	6	(±20,0)	
30 - 39	9	(22,0)	2	(±10,5)	7	(±23,3)	
40 - 49	16	(36,6)	6	(±31,5)	10	(±33,3)	0,366 ^b
> 50	15	(19,5)	8	(±42,3)	7	(±23,3)	2,238 ^c
Sexo							
Masculino	26	(53,6)	11	(57,8)	15	(50,0)	0,291
Feminino	23	(46,4)	8	(42,2)	15	(50,0)	
Escolaridade							
< 4 anos	17	(34,6)	6	(31,3)	11	(36,7)	0,41
4 - 8 anos	32	(66,4)	13	(68,7)	19	(63,3)	
Ocupação							
Dona de casa	2	(4,1)	0		2	(6,6)	
Desempregado	38	(77,5)	16	(84,2)	22	(73,3)	0,0002
Aposentado	9	(18,5)	3	(15,8)	6	(20,0)	
Procedência							
Fortaleza	38	(77,5)	15	(78,9)	13	(43,3)	
Região							
metropolitana	5	(10,2)	1	(5,2)	4	(13,3)	
Interior do							
Estado	6	(12,2)	3	(15,9)	3	(43,4)	

Fonte: Própria autora (2018). *p*- teste qui-quadrado de Pearson; DP – desvio padrão.

Quanto às comorbidades e aos hábitos dos pacientes, a maioria não era portadora de diabetes 79,6% (39/49). E de modo semelhante, houve um predomínio de pacientes não portadores de diabetes entre os participantes com resistência a três ou mais fármacos e dois ou menos fármacos (78,5% e 83,3%; TABELA 4).

Analisando os hábitos sociais, foi observado que o hábito de alcoolismo foi descrito em 40,8% (20/49) do total de indivíduos. Não houve diferença significativa entre os participantes etilistas com resistência a três ou mais fármacos e dois ou menos fármacos, contudo foi observada uma frequência maior entre os participantes com resistência a dois ou menos fármacos (43,3%; 13/30). No que se refere ao tabagismo, a maioria dos participantes afirmou que não possui este hábito (63,3%; 38/49). Quanto ao uso de drogas ilícitas, também houve uma predominância de respostas negativas quanto ao hábito (89,8%; 44/49), sendo que este dado foi semelhante ao encontrado nos pacientes com resistência a três ou mais fármacos (84,2%; 16/19) e dois ou menos fármacos (93,4%; 27/29).

Tabela 4 - Fatores de riscos associados ao fenótipo de resistência obtido pelo sistema BACTEC MGIT 960 dos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.

	Total N = 49 (%)	≥ 3 fármacos N=19 (%)	< 2 fármacos N= 30 (%)	p
Diabetes				
Sim	10 (20,4)	4 (21,5)	5 (16,7)	0,7110
Não	39 (79,6)	11 (78,5)	19 (83,3)	
Etilismo				
Sim	20 (40,8)	5 (26,3)	13 (43,3)	0,3621
Não	29 (59,2)	14 (73,7)	17 (56,6)	
Tabagismo				
Sim	18 (36,7)	6 (31,57)	11 (36,6)	1,000
Não	38 (63,3)	11 (68,42)	19 (63,3)	
Drogas ilícitas				
Sim	5 (10,2)	3 (15,8)	2 (6,6)	0,3715
Não	44 (89,8)	16 (84,2)	27 (93,4)	

Fonte: Própria autora (2018). *p*- teste qui-quadrado de Pearson.

A tabela 5 mostra os aspectos clínicos dos 49 pacientes participantes desse estudo. Foi observado que 79,6% (39/49) dos indivíduos não possuíam histórico de tratamento contra a TB. Esta frequência foi semelhante quando comparado os participantes com resistência a três ou mais fármacos e dois ou menos fármacos (79,0% e 80%). Quando perguntados sobre o possível local de contágio, 69,4% (34/49) dos participantes não souberam informar o possível local onde adquiriram.

Sobre o número de contatos intradomiciliares, a maioria dos participantes, ou seja 85,7% (42/49) afirmaram residir com cinco ou menos pessoas (TABELA 5). A análise dos exames de imagem do raio-X de tórax evidenciou a predominância em todos os participantes de lesões bilaterais cavitárias com 67,3% (33/49). Contudo, a lesão bilateral cavitária foi mais comum entre os participantes com resistência a três ou mais fármacos (73,7%; 14/19) em relação aos participantes com resistência a dois ou menos fármacos (63,4%; 19/30). Quanto a quantificação da baciloscopia, 63,3% (31/49) do total dos participantes apresentavam como resultado o padrão de duas ou três cruzes, sendo este resultado foi semelhante ao observado entre os casos com resistência a três ou mais fármacos (47,9%; 13/19) e a dois ou menos fármacos (60%; 18/30).

Tabela 5 - Aspectos clínicos apresentado pelos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.

	Total N = 49 (%)	≥3 fármacos N=19 (%)	< 2 fármacos N= 30 (%)	p
História de tratamento anterior				
Sim	10 (20,4)	4 (21,0)	6 (20,0)	0,2379
Não	39 (79,6)	15 (79,0)	24 (80,0)	
Local do provável contato				
Ignorado	34 (69,4)	14 (73,7)	20 (66,6)	1,000
Intradomicílio	15 (30,6)	5 (26,3)	7 (33,4)	
Número de contatos				
δ 5	42 (85,7)	16 (84,2)	26 (86,6)	1,000
>5	7 (15,3)	3 (15,8)	4 (13,4)	
Padrão da radiografia do tórax				
Unilateral cavitária	10 (20,4)	2 (10,5)	8 (26,6)	
Unilateral não cavitária	6 (12,2)	3 (15,8)	3 (10,0)	
Bilateral cavitária	33 (67,3)	14 (73,7)	19 (63,4)	
Baciloscopia (No de cruzes)				
Uma	18 (36,7)	6 (26,3)	12 (40,0)	
Duas	11 (22,4)	8 (31,6)	3 (10,0)	
Três	20 (40,9)	5 (16,3)	15 (50,0)	

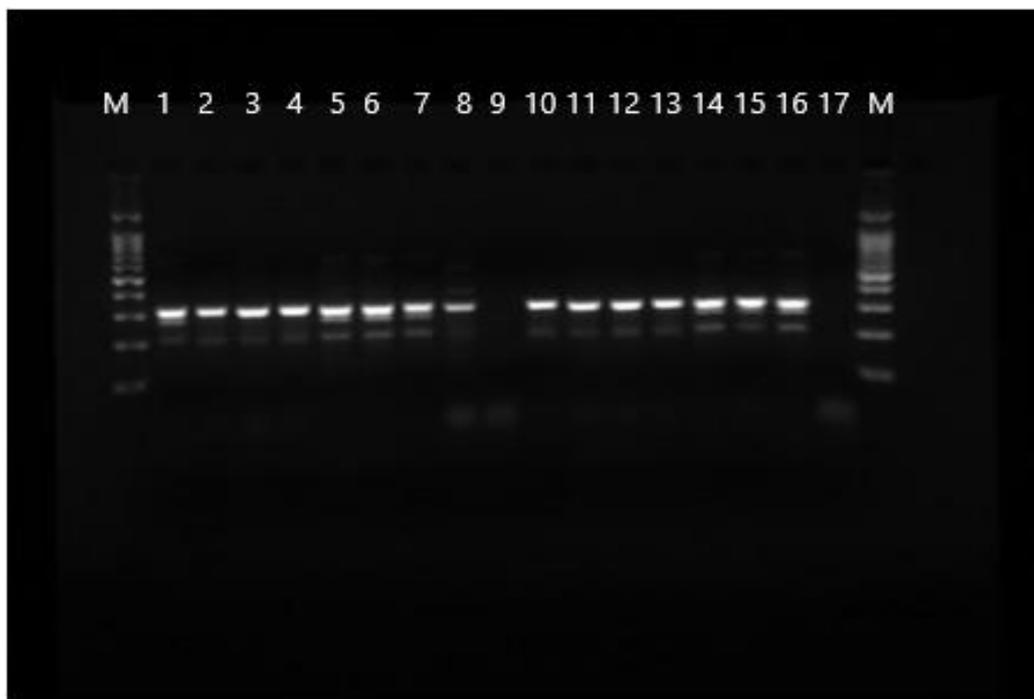
Fonte: Própria autora (2018). *p*- teste qui-quadrado de Pearson.

4.3 Caracterização genômica da resistência às drogas anti-TB

4.3.1 Gene *rpoB*

As amostras extraídas foram submetidas às reações de PCR para a identificação do gene *rpoB*. Todas as amostras analisadas por PCR não apresentaram mutação no códon 531 do gene.

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 3% com produtos de amplificação do códon 531 do gene *rpoB* de *M. tuberculosis*.

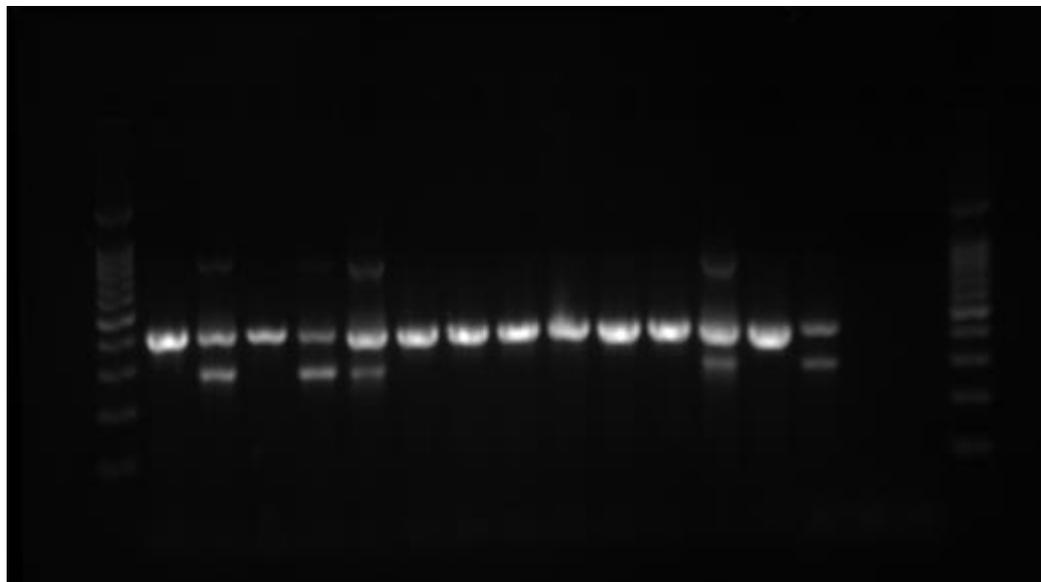


Fonte: Própria autora (2018). Gel de agarose 3% de produtos de amplificação da região 531 do gene *rpoB*. Poços M: marcadores 100pb; poços 1 a 8 e 10 a 15 representam amostras sem mutação no códon 531 do gene *rpoB*, produtos de 164 pb e 243 pb. Poço 9: amostra sem amplificação. Poço 16: controle positivo com a cepa padrão H37Rv *M. tuberculosis* e poço 17: controle negativo com H₂O.

4.3.2 Gene *katG315*

Das 42 amostras analisadas, 85,71% (36/42) apresentaram mutação no códon 94 do gene *katG* códon 315.

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 3% com produtos de amplificação do códon 315 do gene *katG* de *M. tuberculosis*.



Fonte: Própria autora (2018). Gel de agarose 3% de produtos de amplificação da região *katG* 315. Poços M - marcadores 100pb; 2, 4, 5 e 12 representam amostras sem mutação no códon 315 do gene *katG*, produtos de 296pb e 454pb. Poços 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 13 amostras com mutação (produto de 454pb); CP - controle positivo com a cepa padrão H37Rv *M. tuberculosis* e CN - controle negativo com H₂O.

5 DISCUSSÃO

A idade média da população estudada foi de 40,4 anos e em relação ao sexo, houve um predomínio de homens em relação ao total de participantes, semelhante a outros estudos publicados no país. Pode-se associar a prevalência de homens nos resultados advindos de tratamentos irregulares e abandono de tratamento, onde na literatura está diretamente associada ao sexo masculino (FERREIRA *et al.*, 2005; CÂMARA *et al.*, 2016; MARQUES 2017).

Quanto à escolaridade entre quatro e oito anos de estudo, houve um predomínio de indivíduos com isolados de *M. tuberculosis* com resistência maior ou igual a três fármacos (68,7%). Resultado semelhante foi encontrado em um estudo realizado com base nos registros apresentados pela Vigilância Epidemiológica do Município de Londrina, onde percebeu-se que do total de pacientes estudados, 22,4% tinham entre quatro e sete anos de estudo (GIROTI *et al.*, 2018).

A instrução dos indivíduos é um fator importante para o favorecimento de aquisição de renda e condições de moradia, fatores que influenciam diretamente a saúde dos pacientes, principalmente por afetar a capacidade de entendimento das informações em tratamentos e a adesão de procedimentos terapêuticos, aumentando a vulnerabilidade à TB e resultando em uma fraca adesão ao tratamento. Além disso, conhecer o grau de escolaridade dos pacientes com TB ajuda a delimitar um possível grupo de risco, o que ajuda a criar novas ações direcionadas para esses pacientes (NOGUEIRA *et al.*, 2004).

No que se refere à procedência, entre os casos de apresentaram TB-MDR, a maioria residia em Fortaleza. Nacionalmente, o problema do tratamento da TB e o aparecimento de cepas resistentes está associada a alta taxa abandono que em algumas capitais pode atingir uma média de 25% dos pacientes em tratamento (PAZ, *et al.* 2012). De acordo com a Secretaria de Saúde do estado do Ceará (2018), cerca de 61% do casos de TB se concentra na capital do estado, Fortaleza (HIJJAR, 2006; BRASIL 2012).

Entre os fatores de risco associados à resistência, a maioria dos participantes não eram diabéticos. A diabetes é uma comorbidade associada como fator de risco para desenvolvimento da TB (CARREIRA, *et al.*, 2012; REIS-SANTOS *et al.*, 2013). No entanto, nesse estudo, não houve diferença significativa entre os doentes diabéticos ou não diabéticos quanto ao diagnóstico de TB-DR.

A TB resistente também geralmente está associada a outras debilidades no sistema imunológico do paciente, causadas por hábitos como o uso de drogas lícitas e ilícitas (BARREIRA, 2018). No presente trabalho, o etilismo foi significativamente dominante com

relação ao total de participantes. No entanto, cerca de 43,3% dos indivíduos com resistência à até dois fármacos apresentam este hábito. Bergel e Gouveia (2005) relataram em sua pesquisa que os pacientes apresentaram uma probabilidade de aproximadamente quatro vezes maior de abandonar o tratamento quando eram dependentes do álcool, o que está diretamente relacionado com o aparecimento de cepas resistentes. Corroborando com o resultado supracitado, um trabalho realizado no Ceará que analisou fatores de risco para TB multirresistente adquirida demonstrou a associação de tabagismo e alcoolismo como fatores de risco para desenvolver resistência a drogas (BARROSO *et al.*, 2001).

Souza (2006) destacou em seu estudo que pacientes com histórico anterior de tratamento contra TB apresentam cerca de catorze vezes mais chances de desenvolver tuberculose multirresistente. No entanto, os resultados adquiridos neste estudo demonstram que grande parte dos participantes (64,9%) não apresentam nenhuma história prévia de tratamento, mostrando que os pacientes adquiriram TD-MDR sem realizar nenhum tratamento com antimicobacterianos. Deste modo, caracterizando a transmissão da resistência primária nestes pacientes. Em um estudo, também realizado em Fortaleza em 2007, foi mostrado resistência primária de 15,7% (LUIZ *et al.*, 2013).

Uma das principais fontes de infecção é forma pulmonar (cavitária) da TB, pois é envolvida diretamente com a eliminação dos bacilos pela tosse, espirro e principalmente pela fala. No estudo aqui descrito, a presença de lesões bilaterais cavitárias foram predominantes, sendo encontrada em 67,3% dos participantes. Em trabalho realizado no Espírito Santo foi avaliado o perfil epidemiológico dos casos de TB multirresistente e mostrou que o exame radiológico realizado em 54 dos 57 casos estudados, permitiu avaliar que, destes, 42 (77,8%) eram cavitários, 11 (20,4%) não-cavitários e 1 (1,8%) normal (VIEIRA *et al.*, 2007). A pesquisa de Siqueira *et al* mostrou que durante o tratamento para TB-MDR, indivíduos que apresentavam lesão bilateral cavitária apresentavam pior evolução no tratamento e o número de mortes foi de aproximadamente 7 vezes maior que nos pacientes com lesão unilateral, onde ele associa que o maior número de focos das formas cavitárias propiciam a maior frequência de mutantes resistentes. A radiografia por seu baixo custo e a facilidade da sua realização se torna um constituinte importante, pois auxilia no diagnóstico da TB, detectando lesões, principalmente em casos de TB-MDR.

A baciloscopia é um dos principais recursos para o diagnóstico da TB, pois permite diagnosticar a doença rapidamente, apesar da baixa sensibilidade, permitindo o início do tratamento (NOGUEIRA, 2004). A quantificação baciloscópica no escarro dos pacientes mostrou que 63,3% apresentavam o resultado padrão de duas ou três cruces. Coelho (2007)

ressalta que a baciloscopia apesar de não ser um exame com alta sensibilidade e que permita a identificação de resistência aos fármacos, deve ser feita em qualquer paciente com suspeita de TB, auxiliando no diagnóstico da doença e assim evitando que ocorra erros no tratamento do indivíduo.

Os resultados obtidos com a caracterização do perfil de resistência dos fármacos detectaram que 24,5% das amostras se mostraram resistentes a um fármaco, 36,7% apresentaram resistência a dois e 38,8% a três ou mais fármacos. Outros estudos já mostraram índices diferentes do que é descrito nesse estudo. Uma pesquisa realizada por Gonçalves (2012) mostrou que 13% das amostras de pacientes do estado de São Paulo apresentaram fenotipicamente algum perfil de resistência. Em Minas Gerais, Clemente *et al* (2008) descreveram um percentual de 17% de resistência nas cepas utilizadas no seu estudo.

Das cepas utilizadas no estudo aqui descrito, a resistência a I foi dominante, sendo detectada em 14,3% das amostras. A resistência somente a R foi encontrada em 8,2% das cepas. No estado do Maranhão (SILVA; MOURA; CALDAS, 2014), em estudo sobre o padrão de evidenciou a predominância de resistência à R (88,5%) e I (94,8%). A variação entre as regiões já é esperada devido às diferenças sócio econômicas, levando em consideração que o aumento da TB-MDR está diretamente relacionado com as desigualdades sociais a qual os indivíduos acometidos estão inseridos.

A detecção de mutações nos genes associados à resistência aos fármacos em cepas de *M. tuberculosis* por técnicas moleculares se torna cada vez mais necessário para o controle da TB-MDR. Diversos trabalhos já foram descritos associando a resistência à I aos genes *katG* e *inhA* (MOKROUSOV *et al.*, 2002; YANG *et al.* 2005).

No presente estudo, os resultados da PCR-MAS das 42 amostras de isolados de *M. tuberculosis* analisadas, 85,7% (36/42) apresentaram mutação no códon 315 do gene *katG*. Em uma pesquisa realizada por Souza (2013) apenas quatro amostras apresentaram mutação neste gene, sendo que o teste fenotípico constatou 18 amostras fenotipicamente resistentes à I. A resistência nessas cepas pode estar associada a mutações em outras regiões do gene *katG* ou em outros genes como *kasA*, *ahpC* ou *ndh* (LAURENZO; MOUSA, 2011). Estes genes não foram investigados no protocolo empregado neste estudo.

A resistência a R está relacionada a mutações no gene *rpoB*. Nesse estudo o desempenho da PCR-MAS foi discordante dos resultados encontrados nos testes fenotípicos, pois não foi detectada nenhuma mutação no códon 531 analisado. A resistência dessas cepas pode estar associada também a mutações em outros códons deste, na região entre as sequências nucleotídicas 507-533 (MOKROUSOV *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que é essencial fazer o levantamento epidemiológico do padrão de resistência. Os dados são importantes para embasar as decisões terapêuticas e monitorar o padrão de resistência aos fármacos antimicobacterianos em uma determinada população onde a TB é endêmica.

6 CONCLUSÃO

Das amostras analisadas no sistema BD BACTEC MGIT 460TB 24,9% das apresentaram resistência a um fármaco. A resistência foi detectada simultaneamente nos quatro fármacos testados em 22,4% das amostras.

Foi evidenciado que alguns fatores de risco são determinantes para o desenvolvimento de cepas resistentes nos pacientes. A idade média dos participantes foi de 40,9 anos. Quanto ao sexo, houve um predomínio de mulheres quanto aos participantes com resistência a três ou mais fármacos. A maioria dos pacientes que estavam desempregados apresentaram resistência três ou mais fármacos.

Apesar da diabetes ser classificada como um fator de risco para o desenvolvimento de TB-DR, a maioria dos participantes não apresentava essa comorbidade. Entretanto, o etilismo foi predominante no total de participantes, se caracterizando como um fator de risco importante para o desenvolvimento de resistência a drogas utilizadas no tratamento.

Um dos resultados que mostra a dificuldade do controle da TB atualmente é a inconsistência dos dados, principalmente da falta de informação sobre o possível local de infecção dos pacientes. Além disso, o elevado número de indivíduos com TB-MDR que nunca participaram de nenhum tratamento prévio contra a TB relata que cepas resistentes estão cada vez mais disseminadas entre a população.

A detecção de mutações nos genes constatou que a maioria das amostras apresentou mutação no códon 315 do gene *katG*. Quanto a resistência a R, não foi detectada nenhuma mutação no códon 531 do gene *rpoB*, indicando que outras regiões devem ser analisadas, para se detectar a mutação em outros códons.

Este trabalho ressalta a necessidade de um maior investimento nas estratégias de controle da TB e da TB-MDR, sendo necessária melhores estruturas de atendimento aos pacientes, intensificando as ações de prevenção e detecção.

Além disso, é importante ressaltar que os diagnósticos moleculares, como a PCR-MAS, se mostram como técnicas promissoras, que facilitam a detecção, tornando mais rápida e eficaz a caracterização da TB-MDR.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, K. A. *et al.* Novel Mycobacterium tuberculosis Complex Pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, v. 16, n. 8, p.1296-1299, ago. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20678329>>. Acesso em: 9 ago. 2018.
- ARANAZ, A. Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**. Espanha, v. 53, n. 6, p.1785-1789, 1 nov. 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657105>>. Acesso em: 13 set. 2018
- BARREIRA, D. Os desafios para a eliminação da tuberculose no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Pará, v. 27, n. 1, p.1-4, mar. 2018. Instituto Evandro Chagas. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ress/v27n1/2237-9622-ress-27-01-e00100009.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2018.
- BARROSO, E. C.; RODRIGUES, J. L. N.; PINHEIRO, V. G. F.; CAMPELO, C. L. Prevalência da tuberculose multirresistente no Estado do Ceará, 1990-1999. **Jornal de Pneumologia**. Ceará, v. 27, n. 6, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-35862001000600004>>. Acesso em: 28 jun. 2018.
- BERGEL, F. S.; GOUVEIA, N. Retornos frequentes como nova estratégia para adesão ao tratamento de tuberculose. **Revista de Saúde Pública**., São Paulo, v. 39, n. 6, p.898-905, dez. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89102005000600005>. Acesso em: 01 ago. 2018.
- BISHOP, P. J; NEUMAN, G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. **Tubercle**, Londres, n. 51, p.196-206, mar. 1970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4099679>>. Acesso em: 05 ago. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Tratamento diretamente observado (TDO) da tuberculose na atenção básica: protocolo de enfermagem**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 168p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Panorama da tuberculose no Brasil: indicadores epidemiológicos e operacionais**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. p. 92.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico: TB**. Brasil, mar. 2018. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/26/2018-009.pdf>. Acesso em: set. 2018.
- BROSCH, R. *et al.* A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. **Proceedings of The National Academy of Sciences**. EUA, v. 99, n. 6, p.3684-3689, 12 mar. 2002. Proceedings of the National Academy of Sciences. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.052548299>>. Acesso em: 08 ago. 2018.
- CANTÓN, E. C. R. Procedimientos en Microbiología Clínica. **Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 2005.

Disponível em: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/recomendaciones/seimc-rc-2015-MERScov.pdf>. Acesso em: 03 ago. 2018.

CARREIRA, S. *et al.* Impacto da diabetes na forma de apresentação da tuberculose em doentes hospitalizados. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. Portugal, v. 18, n. 5, p.239-243, set. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0873215912000360>. Acesso em: 03 set. 2018.

CARVALHO, W. S. *et al.* Diagnóstico de resistência do Mycobacterium tuberculosis à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, Belo Horizonte, p.31-39, mar. 2007. Trimestral. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n1/03.pdf>. Acesso em: 03 set. 2018.

CATTOIR, V. Identification moléculaire des mycobactéries et détection de la résistance aux antibiotiques. **Annales de Biologie Clinique**. França, v. 62, n. 4, p. 405-413. 2004. Disponível em: https://www.jle.com/download/abc-263270-identification_moleculaire_des_mycobacteries_et_detection_de_la_resistance_aux_antibiotiques_--W@2HJH8AAQEAAAB-y@tYAAAAN-a.pdf. Acesso em: 17 jul. 2018.

CEARÁ. **Secretaria de Saúde. Boletim epidemiológico: TB**. Fortaleza, mar. 2018. Disponível em: www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins. Acesso em: set. 2018.

CHEN, J., CHEN, Z., LI, Y. Characterization of gyrA and gyrB mutations and fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Hubei Province. **Braz J Infect Dis**. China, vol. 16, no. 2, p. 136-141. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22552454>. Acesso: 12 ago. 2018.

COELHO, Andréa Gobetti Vieira. **PERFIL DA TUBERCULOSE MULTIDROGA RESISTENTE NO MUNICÍPIO DE SANTOS, 2000-2004**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2007

COLE, S.T. *et al.* Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, London, v. 396, n. 394, p.651-653, 12 nov. 1998. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/31159.pdf>. Acesso em: 07 set. 2018.

COUSINS, D. V. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. nov.. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**. v. 53, n. 5, p.1305-1314, 1 set. 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02401-0>. Acesso em: 07 set. 2018.

CUNHA, Eunice Atsuko Totumi *et al.* A diagnosis of pulmonary tuberculosis and drug resistance among inmates in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 51, p.324-330, 06 jun. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v51n3/1678-9849-rsbmt-51-03-324.pdf>. Acesso em: 01 set. 2018

DUARTE, Raquel *et al.* Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. Vila Nova de

Gaia, v. 16, n. 4, p.559-2010, 10 jan. 07. Mensal. Disponível em:
<<http://www.scielo.mec.pt/pdf/pne/v16n4/v16n4a04.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2018

EUZÉBY, J. P.; PARTE, A. C. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus Mycobacterium. 2017.** Disponível em:
<<http://www.bacterio.net/mycobacteriaceae.html> >. Acesso em: 12 set. 2018.

FORRELLAD, M. A. *et al.* Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence.** v. 4, n. 1, p.3-66, jan. 2013. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.4161/viru.22329>>. Acesso em: 29 ago. 2018.

FREGONA, G. ; *et al.* Fatores associados à tuberculose resistente no Espírito Santo, Brasil. **Revista de Saúde Pública.** v. 51, n. 41, 2017. Disponível em:
<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v51/pt_0034-8910-rsp-S1518-87872017051006688.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2018.

GANDHI N. R. *et al.* Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. **Lancet** 2006;368:1575-80.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. E. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. **Fems Microbiology Reviews.** v. 36, n. 3, p.514-532, mai 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

GIROTI, S. K. O.; BELEI, R. A.; MORENO, F. N.; SILVA, F. S. Perfil dos pacientes com tuberculose e os fatores associados ao abandono do tratamento. **Cogitare Enfermagem,** v. 15, n. 2, 2010. Disponível em:
<<https://revistas.ufpr.br/cogitare/article/download/17860/11653>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

GONÇALVES, M. G. *et al.* Fast test for assessing the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and rifampin by real-time PCR. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 107, p.903-908, nov. 2012. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23147147>>. Acesso em: 15 set. 2018.

HERSHKOVITZ, I. *et al.* Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. **Plos One.** v. 3, n. 10, p.1-6, 15 out. 2008. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003426>>. Acesso em: 15 set. 2018.

HOFFMANN, C. *et al.* Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proceedings of The National Academy of Sciences.** v. 105, n. 10, p.3963-3967, 3 mar. 2008. . Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709530105>>. Acesso em: 24 jun. 2018.

HOFT, D. *et al.* A new recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. **Journal of Infectious Diseases.** Oxford, p. 1491-1501, 2008. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18808333>>. Acesso em: 24 set. 2018.

HULL, S. I. *et al.* Presence of aminoglycoside acetyltransferase and plasmids in Mycobacterium fortuitum. Lack of correlation with intrinsic aminoglycoside resistance. **Am**

Rev Respir Dis. v. 129; p. 614 – 618, 1984. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6712002>>. Acesso em: 05 set. 2018.

JAGIELSKI, T. *et al.* Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and Other Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 29, n. 2, p.239-290, 24 fev. 2016. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00055-15>. Disponível em:

<<https://cmr.asm.org/content/cmr/29/2/239.full.pdf>>. Acesso em: 07 set. 2018.

JANKOVIC, M. *et al.* Geographical distribution and clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria in Croatia. **The International Journal Of Tuberculosis And Lung Disease**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.836-841, 1 jun. 2013. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.12.0843>.

KALOKEH, A. S. *et al.* Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing: a review of the literature. **Am J Med Sci.**, v.345, n.2 p.143–148, 2014.

KAUFMANN, S. H. E.; SCHAIBLE, U. E. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. **Trends In Microbiology.** v. 13, n. 10, p.469-475, Oct. 2005. Semanal. Elsevier BV. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2005.08.003>>. Acesso em: 12 set. 2018.

KUMARIA, R. *et al.* Molecular detection of drug resistance to ofloxacin and kanamycin in Mycobacterium tuberculosis by using multiplex allele-specific PCR. **J Infect Public Health**, v.11, n.1, p.54-58, 2017.

LABORCLIN PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA. (Paraná). **Manual para antibiograma:** difusão em disco (Kirby e Bauer. Pinhais: Larboclin, 2011. 29 p. (05).

Disponível em: <http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf>. Acesso em: 18 set. 2018.

LIMA, C. H. S.; BISPO, M. L. F.; SOUZA, M. V. N. Pyrazinamide: An Essential Drug in the Tuberculosis Treatment. **Revista Virtual de Química.** v. 3, n. 3, p.159-180, 2011.

<http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20110021>

LUIZ, R. S. S. *et al.* Genotyping and drug resistance patterns of Mycobacterium tuberculosis strains observed in a tuberculosis high-burden municipality in Northeast, Brazil. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases.** Ceará, v. 17, n. 3, p.338-345, maio 2013.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.019>>. Acesso em: 07 set. 2018.

MATSUMOTO, C. K. *et al.* Demonstration of Plasmid-Mediated Drug Resistance in Mycobacterium abscessus. **Journal Of Clinical Microbiology.** v. 52, n. 5, p.1727-1729, 26 fev. 2014. American Society for Microbiology. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00032-14>. Acesso em: 03 set. 2018.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTE: de onde vem a

resistência?. Rio de Janeiro: Boletim de Pneumologia Sanitária, v. 7, n. 1, jan. 1999.

Semestral. Disponível em: <<http://scielo.iec.gov.br/pdf/bps/v7n1/v7n1a06.pdf>>. Acesso em: 07 set. 2018.

MOKROUSOV, I.; OTTEN, T.; VYSHNEVSKIY, B.; NARVSKAYA, O. Allele-specific rpob PCR assays for detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis in Sputum

Smears. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 47, n.7, p. 2231–2235, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12821473>. Acesso em: 05 set. 2018.

NAMBURETE, E. I. *et al.* Characterization of resistance profile of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Beira, Sofala - Mozambique. **Medicina (ribeirao Preto. Online)**. São Paulo, v. 49, n. 4, p.338-343, 11 nov. 2016. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v49i4p338-343>. Disponível em: <<http://revista.fmrp.usp.br/2016/vol49n4/AO5-Characterizacao-do-perfil-de-resistencia-do-Mycobacterium-tuberculosis-isolado-de-pacientes.pdf>>. Acesso em: 03 set. 2018.

NARASIMHAN, P. *et al.* Risk factors for tuberculosis. **Pulm Med**, v. 2013, p. 1-11, 2013. Disponível em: < <https://www.hindawi.com/journals/pm/2013/828939>>. Acesso em: 10 set. 2018.

NOGUEIRA, P. A.; ABRAHÃO, R. M. C. M.; MALUCELLI, M. I. C. Sputum bacilloscopy in patients admitted into tuberculosis hospitals in the State of São Paulo. **Rev. Bras. Epidemiol**, São Paulo, v. 7, n. 1, p.54-65, jan. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbepid/v7n1/07.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2018.

NUNES, E. A CAPITANI, E. M., COELHO, E., PANUNTO, A. C., JOAQUIM, O. A., RAMOS, M.C, Doença pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não-tuberculosas entre pacientes recém-diagnosticados como HIV positivos em Moçambique, África. **J. bras. pneumol**. V. 1.34, n. 10, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132008001000011>. Acesso em: 10 set. 2018.

OLIVEIRA, D. M. ***Mycobacterium tuberculosis* e a resistência do bacilo de Koch**. 2013. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5525/1/PPG_19627.pdf>. Acesso em: 10 set. 2018.

PFYFFER, G. E.; PALICOVA, F. *Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures* *. **Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition**. p.472-502, 01 jan. 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/9781555816728.ch28>>. Acesso em: 10 set. 2018.

PRIM, R. I. **Caracterização molecular de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à isoniazida e/ou rifampicina isoladas de amostras clínicas do estado de Santa Catarina**. 2014. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/123249/327209.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 13 set. 2018

RODRIGUES, A. **Gênero *Mycobacterium*. Gênero *Nocardia*. Gênero *Actinomyces***. Porto, 2006. 11 slides, color. Disponível em: <https://users.med.up.pt/~cc04-10/Microdesgravadas/14_Micobacterias.pdf>. Acesso em: 01 set. 2018.

SHOUB, H. L. A COMPARISON OF THE ZIEHL-NEELSEN AND SCHULTE-TIGGES METHODS OF STAINING TUBERCLE BACILLI. **J Bacteriol**, New York, v. 2, n. 8, p.121-126, 2 ago. 1922.

SILVA, P. F.; MOURA, G. S; CALDAS, A. J. M. Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose pulmonar no Maranhão, Brasil, no período de 2001 a 2010. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 30, n. 8, p.1745-1754, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v30n8/0102-311X-csp-30-8-1745.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2018.

SIQUEIRA, H. R. *et al.* Evolução clínica de um grupo de pacientes com TB multirresistente atendidos em um centro de referência na cidade do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. São Paulo, p. 54-62. jan. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v35n1/v35n1a08.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

SIU, G.K. *et al* Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother**; v.66.n.4:730-43. 2011.

SOUZA, M. A. **Avaliação do desempenho da PCR Multiplex alelo específico para detecção de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência à Rifampicina e à Isoniazida, a partir de amostra clínica**. 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013. Disponível em: <<https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/2565/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20M%C3%A1rcia%20Alves%20de%20Souza.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2018.

SOUZA, M. B.; ANTUNES, C. M. F.; GARCIA, G. F. Perfil de sensibilidade e fatores de risco associados à resistência do *Mycobacterium tuberculosis*, em centro de referência de doenças infectocontagiosas de Minas Gerais. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 32, n. 5, p.430-437, out. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37132006000500010>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

SUTRE, A. F. M. A. **Estudo molecular da resistência à rifampicina do complexo *Mycobacterium tuberculosis* numa população da Guiné-Bissau**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010. Disponível em: <http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/2579/1/ulfc090563_tm_A_Sutre.pdf>. Acesso em: 12 set. 2018.

UNISSA, N. Insights into RpoB clinical mutants in mediating rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Mol Graph Model** v.67 p.20-32,2016.

VADWAI, V., Shetty, A., Rodrigues, C., 2012. Multiplex allele specific PCR for rapid detection of extensively drug resistant tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 92, n.3, p.236-242, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22342856>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

VAN INGEN, J. *et al.* Characterization of *Mycobacterium orygis* M. tuberculosis Complex Subspecies. **Emerging Infectious Diseases**. v. 18, n. 4, p.653-655, abr. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid1804.110888>>. Acesso em: 16 ago. 2018.

VAN SOOLINGEN, D. *et al.* A Novel Pathogenic Taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, [s.l.], v. 47, n. 4, p.1236-1245, 1 out. 1997. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-47-4-1236>.

VERZA, M. **Detecção da mutação mais frequente no códon 315 do gene katG relacionada com a resistência à isoniazida em isolados de *Mycobacterium tuberculosis***. 2008. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/15474/000667115.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 25 jun. 2018.

VIEIRA, R. C. A. *et al.* Epidemiological profile of multidrug-resistant tuberculosis cases in Espírito Santo. **Revista brasileira de epidemiologia**. v. 10, n. 1, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v10n1/06.pdf>>. Acesso em: 27 jun. 2018.

WHO **Global tuberculosis report 2015**, 20th ed. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/191102>>. Acesso em: 13 set. 2018.

WHO. **Global tuberculosis report 2017**. Who Press. Genebra. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017_main_text.pdf>. Acesso em: 13 set. 2018.

WHO (Comp.). **The End TB Strategy: Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015**. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/tb/strategy/End_TB_Strategy.pdf?ua=1>. Acesso em: 24 set. 2018

YANG, Z.; DURMAZ, R.; YANG, D.; GUNAL, S.; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; SANIC, A.; 21 MARRS, C.F. Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, n.4, p. 201- 208, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16243477>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

ZHANG, Y., Yew, W. W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease** **19**, n. 11, p. 1276-1289, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26467578>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

ANEXO

ANEXO A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Esclarecimento

Você está sendo convidado a participar do estudo de *Mycobacterium tuberculosis* Multidrogra (MDR) e Extensivamente Resistente (TB-XDR) em pacientes com história de tratamento anterior em serviço de referência no Estado do Ceará”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é: Determinar e compreender as variáveis da frequência de TB XDR e TB MDR relacionadas ao ambiente domiciliar e da comunidade, frente às características genéticas do hospedeiro e do bacilo, visando melhorar as metodologias empregadas no controle e prevenção da TB resistente. Caso você participe, será necessário a *coleta de escarro e respostas de perguntas relacionadas a TB*. Serão realizados exames de tipagem genética a partir da cultura da bactéria e teste de sensibilidade às drogas anti-tuberculose.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer tipo de pagamento, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias à realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento no estudo, pois você será identificado com um número (registro do laboratório). Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os investigadores são: Dr^a *Cristiane Cunha Frota* que pode ser encontrada no endereço *Divisão de Microbiologia Médica, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado, S/N. Rodolfo Teófilo, Fortaleza. Telefone (085) 3366-8303*. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Messejana; telefone (085) 3101-4162.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li e/ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Mycobacterium tuberculosis Multidrogra (MDR) e Extensivamente Resistente (TB-XDR) em pacientes com história de tratamento anterior em serviço de referência no Estado do Ceará.”.

Eu,....., li e/ou ouvi o esclarecimento acima e ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e entendo que sou livre para interromper meu consentimento a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

----- Assinatura do paciente

Data ____/____/____

----- Assinatura do representante legal

Data ____/____/____

----- Assinatura da testemunha

ANEXO B Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – via Plataforma Brasil

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MULTIDROGA E EXTENSIVAMENTE RESISTENTE EM UNIDADE DE REFERENCIA

Pesquisador: THALES ALVES CAMPELO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 02835016.1.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.956.894

Justificativa de Ausência	tote_.pdf	07/10/2016 11:01:25	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Carta_de_apreciacao.jpg	31/10/2016 15:37:53	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_concordancia.jpg	31/10/2016 15:19:02	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	30/10/2016 14:43:38	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	21/10/2016 16:04:38	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Questionario.pdf	18/10/2016 10:48:06	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Termo_de_Fiel_Depositario.pdf	16/10/2016 10:04:30	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Termo_de_Anuencia_Ambulatorio_de_Tisiologia.pdf	16/10/2016 09:58:45	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	confirmacao_do_cadastro_na_pesquisa clinica.pdf	16/10/2016 09:54:31	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_laboratorio_de_analise clinicas.pdf	16/10/2016 09:40:46	THALES ALVES CAMPELO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 09 de Março de 2017

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FRÓTA BEZERRA
(Coordenador)