UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CINARA SILVA FELICIANO

**Avaliação da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas
através de testes fenotípicos, moleculares comerciais e do
sequenciamento genômico total**

RIBEIRÃO PRETO

2017

CINARA SILVA FELICIANO

**Avaliação da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas
através de testes fenotípicos, moleculares comerciais e do
sequenciamento genômico total**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas,
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Valdes Roberto Bollela

RIBEIRÃO PRETO

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Feliciano, Cinara Silva

Avaliação da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas através de testes fenotípicos, moleculares comerciais e do sequenciamento genômico total, 2017.

119 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Bollela, Valdes Roberto.

1. Tuberculose resistente a múltiplos medicamentos.
2. Testes de sensibilidade microbiana.
3. Sequenciamento genômico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cinara Silva Feliciano

Avaliação da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas através de testes fenotípicos, moleculares comerciais e do sequenciamento genômico total.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas,
Programa de Clínica Médica.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Prof. Dr. Valdes Roberto Bollêla. Não seria suficiente descrever sua competência na orientação desta pesquisa. Dedico esta minha conquista pelo exemplo de professor e ser humano que é. Muito obrigada por tudo que tem feito por mim. Muito obrigada por me permitir crescer e por confiar em mim. Sempre terei você como grande exemplo de professor a ser seguido, em quem me espelho diariamente em todas as minhas atividades. Tenho muito orgulho de ter tido a oportunidade de trabalhar com você. Serei eternamente grata por todo o apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos, me proteger e me dar força nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais Mauro e Maria Alice pelo exemplo de vida e estímulo constante. Minha gratidão pelo apoio incondicional.

À minha tia Marilda pela dedicação de toda uma vida, por estar sempre ao meu lado. Serei eternamente grata.

Ao meu marido Lucas pelo companheirismo, carinho e amor demonstrado em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Roberto Martínez, Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca e Prof. Dr. Fernando Bellíssimo Rodrigues pelas contribuições fundamentais na realização deste estudo.

À amiga Margarida Passeri pela parceria desde a concepção deste projeto.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr, Jéssica Rodrigues Praça, Kamila Peronni e toda a equipe do Centro de Medicina Genômica pela parceria na execução do trabalho.

Enfim, agradeço a todos os meus amigos que torceram por mim e que ajudaram de alguma maneira na realização deste projeto.

RESUMO

FELICIANO, C. S. **Avaliação da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas através de testes fenotípicos, moleculares comerciais e do sequenciamento genômico total.** 2017. 119 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A tuberculose (TB) embora passível de tratamento efetivo, ainda é um grave problema de saúde pública em diversos países, inclusive no Brasil. Nas últimas décadas houve progressos consistentes no controle da doença, porém o avanço da resistência bacilar ainda é um desafio a ser superado, já que os mecanismos da resistência são bastante complexos e não totalmente conhecidos, o que dificulta o desenvolvimento de testes de sensibilidade com elevada acurácia. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as mutações gênicas de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes do Brasil e de Moçambique com doença resistente a drogas através do sequenciamento genômico total, além de descrever padrões de mutações obtidos por testes moleculares comerciais e comparar estes dados com resultados de testes fenotípicos. Estudo descritivo e transversal que incluiu 30 isolados (17 do Brasil e 13 de Moçambique), submetidos aos testes moleculares comerciais Genotype MTBDRplus®, Genotype MTBDRsl®, Xpert MTB/RIF® e teste fenotípico BACTEC MGIT 960 SIRE®. Todos os isolados também foram avaliados pelo sequenciamento genômico realizado pelo Illumina MiSeq Sequencing System® e submetidos a análise de mutações que conferem resistência às drogas contra TB utilizando o *TB profiler online tool*. A sensibilidade e especificidade do sequenciamento genômico para detecção de resistência a rifampicina foi de 87,5% e 92,3%, respectivamente. Além disso, o sequenciamento detectou a mutação (Val170Phe) no gene *rpoB* em dois isolados de *M. tuberculosis* de Moçambique. Esta mutação não é detectada pelos testes genotípicos comerciais. A sensibilidade do sequenciamento para a isoniazida foi de 95,6% e a especificidade de 100%. Para a estreptomicina, a sensibilidade foi de 85,7% e a especificidade de 93,3%. Para o etambutol, observamos sensibilidade de 100% e especificidade de 77,2%. As mutações mais frequentes associadas à resistência à rifampicina foram a Ser450Leu e a His445Tyr no gene *rpoB*. Em relação à isoniazida, predominou a mutação Ser315Thr no gene *katG*. O sequenciamento genômico, dado seu alto poder discriminatório, tem grande potencial de fornecer informações mais acuradas sobre mecanismo gênicos da resistência bacilar, possibilitando futuramente o aprimoramento de testes diagnósticos mais precisos.

Palavras-chave: Tuberculose resistente a múltiplos medicamentos. Testes de sensibilidade microbiana. Sequenciamento genômico.

ABSTRACT

FELICIANO, C. S. **Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to drugs through phenotypic, commercial molecular tests and whole genome sequencing.** 2017. 119 p. Thesis (Doctoral Degree) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Although there is an effective treatment for tuberculosis (TB), it is still a serious public health problem in several countries, including Brazil. In the last decades, there has been consistent progress in disease control, but the increasing number of disease caused by resistant strains is still a challenge to be overcome, since the mechanisms of resistance are quite complex and not fully known, which difficult the development of susceptibility tests with high accuracy. The aim of this work was to characterize gene mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Brazilian and Mozambican patients with drug-resistant disease through whole genome sequencing, as well as to describe patterns of mutations obtained by commercial molecular tests and to compare these data with results of phenotypic susceptibility tests. It was a cross-sectional study that included 30 isolates (17 from Brazil and 13 from Mozambique). Commercial molecular tests Genotype MTBDRplus™, Genotype MTBDRsl™, Xpert MTB / RIF™ and BACTEC MGIT 960 SIRE™ phenotypic test were performed for all isolates. All of them were also evaluated by whole genome sequencing performed by the Illumina MiSeq Sequencing System™ and submitted to analysis of mutations that confer drug resistance against TB using the TB profiler online tool. The sensitivity and specificity of whole genome sequencing for detection rifampicin resistance was 87.5% and 92.3%, respectively. Also, whole genome sequencing detected the mutation (Val170Phe) in the *rpoB* gene in two isolates of *M. tuberculosis* from Mozambique. This mutation is not detected by commercial genotypic tests. The sensitivity of the whole genome sequencing for isoniazid was 95.6%, and the specificity was 100%. For streptomycin, the sensitivity was 85.7%, and the specificity was 93.3%. For ethambutol, we observed a sensitivity of 100% and specificity of 77.2%. The most frequent mutations associated with rifampicin resistance were *rpoB* Ser450Leu and His445Tyr. About isoniazid, the *katG* Ser315Thr mutation was the most frequent. Whole genome sequencing, given its high discriminatory power, has great potential to provide more accurate information about the gene mechanisms of bacilli resistance, making possible the improvement of more accurate diagnostic tests in the future.

Keywords: Drug-resistant tuberculosis. Antimicrobial susceptibility testing. Whole genome sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mutações nos genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> e <i>inhA</i> detectadas	41
Figura 2 - Modelo esquemático da fita de interpretação dos resultados do teste Genotype MTBDRplus	42
Figura 3 - Mutações nos genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rrs</i> e <i>eis</i> detectadas	43
Figura 4 - Modelo esquemático da fita de interpretação dos resultados do teste Genotype MTBDRsl	44
Figura 5 - Descrição das mutações associadas à resistência à rifampicina detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados dos testes de sensibilidade dos isolados do Brasil a esta droga.	58
Figura 6 - Descrição das mutações associadas à resistência à rifampicina detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados dos testes de sensibilidade dos isolados de Moçambique a esta droga.	58
Figura 7 - Descrição das mutações associadas à resistência à isoniazida detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados dos testes de sensibilidade dos isolados do Brasil a esta droga.	59
Figura 8 - Descrição das mutações associadas à resistência à isoniazida detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados dos testes de sensibilidade dos isolados de Moçambique a esta droga.	59
Figura 9 - Descrição das mutações associadas à resistência à estreptomicina detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados do Brasil a esta droga.	60
Figura 10 - Descrição das mutações associadas à resistência à estreptomicina detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados de Moçambique a esta droga.	60
Figura 11 - Descrição das mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados do Brasil a esta droga.	61
Figura 12 - Descrição das mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados de Moçambique a esta droga.	61

Figura 13 - Descrição das mutações associadas à resistência ao etambutol detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados do Brasil a esta droga.....62

Figura 14 - Descrição das mutações associadas à resistência ao etambutol detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados de Moçambique a esta droga.62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil de resistência e de mutações evidenciadas pelos testes de sensibilidade e pelo sequenciamento genômico total dos isolados de Moçambique.....	55
Tabela 2 - Perfil de resistência e de mutações evidenciadas pelos testes de sensibilidade e pelo sequenciamento genômico total dos isolados do Brasil.....	56

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A -	Artigo publicado sobre dados obtidos no projeto piloto desta pesquisa	93
Apêndice B -	Artigo submetido para publicação sobre os resultados finais desta pesquisa.....	97

LISTA DE ANEXOS

Anexo A -	Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP	118
Anexo B -	Aprovação pelo Comitê Nacional de Bioética para Saúde de Moçambique	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DOTS	<i>Directly observed therapy, short-course</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HC	Hospital das Clínicas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LPA	<i>Line probe assay</i>
MIC	Concentração inibitória mínima
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RRDR	Região determinante de resistência a rifampicina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multidroga-resistente
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 Introdução.....	16
1.1 Tuberculose: histórico e epidemiologia	17
1.2 Tuberculose: medidas de controle	19
1.3 Resistência micobacteriana.....	20
1.3.1 Classificação da resistência micobacteriana	20
1.3.2 Epidemiologia da resistência micobacteriana.....	22
1.3.3 Fatores de risco para resistência bacilar	23
1.3.4 Mecanismos de ação e resistência de tuberculostáticos.....	24
1.4 Testes de sensibilidade aos tuberculostáticos	27
1.5 Estudo do genoma do Mycobacterium tuberculosis	31
1.5.1 Técnicas de tipagem molecular.....	31
1.5.2 Sequenciamento genômico total	32
 2 Justificativa.....	 34
 3 Objetivos	 36
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
 4 Materiais e Métodos	 38
4.1 Tipo de estudo.....	39
4.2 Local do estudo	39
4.3 Seleção da amostra	39
4.4 Obtenção dos dados	40
4.4.1 Teste Genotype MTBDRplus.....	40
4.4.2 Teste Genotype MTBDRsl.....	42
4.4.3 Teste Xpert MTB/RIF.....	44
4.4.4 Teste BACTEC MGIT 960 SIRE.....	45
4.4.5 Sequenciamento genômico total	46
4.4.6 Análise de bioinformática	47
4.4.7 Revisão de prontuários médicos	48
4.5 Banco de dados	48

4.6 Análise estatística	48
4.7 Aspectos éticos	48
5 Resultados	50
5.1 Características demográficas dos pacientes incluídos no estudo	51
5.2 Descrição do perfil de sensibilidade e de mutações associadas à resistência a drogas dos isolados estudados	54
5.3 Análise das mutações associadas à resistência bacilar detectadas pelo sequenciamento genômico total para cada droga estudada	57
6 Discussão	63
6.1 Avaliação de mutações associadas à resistência aos fármacos anti-TB e sua correspondência fenotípica	64
6.2 Mutações associadas à resistência à rifampicina.....	66
6.3 Mutações associadas à resistência à isoniazida	67
6.4 Mutações associadas à resistência à pirazinamida.....	68
6.5 Mutações associadas à resistência ao etambutol	70
6.6 Mutações associadas à resistência à estreptomicina.....	71
6.7 Mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas	72
6.8 Mutações associadas à resistência aos aminoglicosídeos injetáveis de segunda linha.....	73
6.9 Limitações do estudo	74
7 Considerações finais	75
Referências	77
Apêndices	91
Anexos	117

1 Introdução

1.1 Tuberculose: histórico e epidemiologia

A tuberculose (TB) é doença causada por espécies de micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, tais como *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. orygi*, capazes de infectar diferentes hospedeiros. Em humanos, a doença é causada principalmente por *M. tuberculosis* e *M. africanum*, espécies cuja transmissão e ciclo de infecção ocorrem de maneira mais eficaz no homem (BRITES; GAGNEUX, 2015).

É considerada uma das doenças infecciosas mais antigas da humanidade (SAN PEDRO; OLIVEIRA, 2013), com evidências de casos em humanos desde a antiguidade (LAWN; ZUMLA, 2011). Ao longo da história, cursou globalmente com elevadas taxas de mortalidade (DANIEL, 2006). No Brasil, por exemplo, foi uma das principais causas de óbitos entre os indígenas, a partir do século XVI (BERTOLLI FILHO, 2001), e causou praticamente um terço dos óbitos no início do século XIX (RUFFINO-NETTO, 1999).

No início do século XX, a melhoria nas condições de moradia, nutrição e renda promoveu redução da taxa de mortalidade atribuída à doença (LAWN; ZUMLA, 2011), antes mesmo do uso clínico de drogas tuberculostáticas, o que ocorreu apenas em 1943, com o desenvolvimento da estreptomicina. Seguiu-se a este avanço a descoberta da isoniazida em 1951 e da rifampicina em 1957. O início do tratamento tuberculostático específico, sobretudo quando combinado, contribuiu para o avanço no controle da doença (DANIEL, 2006; SELIKOFF; ROBITZEK; ORNSTEIN, 1952). Também no início do século XX introduziu-se outra medida de controle, a vacina BCG, que é a única disponível desde então. Entretanto, apesar da ampla distribuição mundial e da proteção conferida contra formas disseminadas da doença na infância, esta vacina foi incapaz de controlar a doença, já que não confere imunidade duradoura durante a vida adulta (TRUNZ; FINE; DYE, 2006).

Atualmente, embora passível de tratamento combinado efetivo, a TB ainda permanece como um importante problema de saúde pública mundial. É a nona causa de morte no mundo e a primeira entre as doenças infecciosas, superando inclusive o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2017).

A doença tem relação direta com a miséria e a exclusão social, afetando principalmente as populações que habitam periferias ou aglomerados urbanos. Possui forte associação com o abuso de álcool, tabaco e outras drogas, carência alimentar e falta de saneamento básico (SAN PEDRO; OLIVEIRA, 2013).

Com o advento da pandemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), houve aumento significativo dos casos, ocasionando maior morbidade e mortalidade. A TB é a principal causa de morte entre pacientes portadores de HIV (BARNES; LAKEY; BURMAN, 2002; BRASIL, 2017; DIERBERG; CHAISSON, 2013; HIJJAR et al., 2005), observando-se nestes pacientes manifestações menos comuns da doença, como quadros pulmonares paucibacilares, formas extrapulmonares e disseminadas (BRASIL, 2011).

Estima-se que em 2016 10,4 milhões de pessoas no mundo desenvolveram TB; sendo 90% adultos, 65% homens e 10% pessoas vivendo com HIV/SIDA. Houve 1,3 milhão de mortes devido à doença entre pacientes não portadores de HIV/SIDA e 374.000 entre pacientes HIV positivos. A maioria dos casos no referido período ocorreu no sudeste asiático (45%), seguido por África (25%) e regiões do pacífico ocidental (17%). Os cinco países de maior incidência, englobando 56% dos casos estimados, foram Índia, Indonésia, China, Filipinas e Paquistão (WHO, 2017).

O Brasil está entre os 30 países que concentram aproximadamente 87% do total de casos de TB, com estimativa de 87.000 novos casos da doença, englobando 11.000 entre portadores de HIV/SIDA, no ano de 2016. Em relação a dados de mortalidade, estimou-se 5.400 óbitos entre pacientes não portadores de HIV e 1.900 entre paciente vivendo com HIV/SIDA (WHO, 2017).

Dados do Ministério da Saúde do Brasil revelaram a notificação de 66.796 novos casos e 12.809 retratamentos em 2016. O coeficiente de incidência da doença passou de 37,9/100.000 habitantes em 2007 para 32,4/100.000 habitantes em 2016, o que ainda é considerado distante da meta para efetivo controle da doença, que prevê menos de 10 casos/100.000 habitantes. O coeficiente de mortalidade apresentou redução de 15,4% no período de 2006 a 2015, passando de 2,6/100.000 habitantes para 2,2/100.000 habitantes. No estado de São Paulo o coeficiente de incidência da doença no mesmo ano foi de 36,4/100.00 habitantes e o de mortalidade foi 1,9/100.000 habitantes (BRASIL, 2017).

Moçambique também faz parte da lista dos 30 países que concentram cerca de 87% dos casos de TB. No ano de 2016 estimou-se 159.000 novos casos da doença, englobando 72.000 casos entre portadores de HIV/SIDA neste país. Em relação a dados de mortalidade, estimou-se 22.000 óbitos entre pacientes não portadores de HIV e 33.000 entre paciente vivendo com HIV/SIDA (WHO, 2017).

A OMS, no ano de 2015, publicou três listas de países com alta carga de TB, que são a lista de países com alta incidência da doença, a lista de países com elevado número de coinfeção TB/HIV e aquela associada à alta carga de TB multidroga-resistente (TB-MDR). O Brasil está incluído nas duas primeiras listas, e Moçambique foi incluído nas três. No entanto, em ambos os países, a taxa de doença causada por bacilos resistentes a drogas é subestimada, dado o baixo número de laboratórios equipados para a realização de testes de sensibilidade (WHO, 2017).

1.2 Tuberculose: medidas de controle

Apesar do grande impacto pelo alto número de casos e mortalidade atribuível, sobretudo em países com piores condições socioeconômicas, a TB permanecia negligenciada pelos governantes até o final do século XX. Assim, a OMS declarou a doença como uma emergência de saúde pública mundial em 1993. Desde então, grandes progressos no controle da doença têm sido realizados, o que é evidenciado no Brasil pela redução da incidência e mortalidade atribuíveis à doença (BRASIL, 2017; HIJJAR et al., 2005; WHO, 2014a; WHO, 2017).

Os progressos continuaram com os projetos implementados subsequentemente, como a estratégia DOTS (*directly observed therapy, short-course*), que fundamenta-se no compromisso político para elaboração de planos de ação e mobilização social; diagnóstico de casos por meio de exames de qualidade; tratamento padronizado e supervisionado; fornecimento eficaz de medicamentos e monitoramento dos casos (WHO, 2010a; WHO, 2017).

Posteriormente, foi desenvolvido o Plano Global para o Combate da Tuberculose (*Stop TB*), que tem como componentes a ampliação da estratégia DOTS; direcionamento de esforços para a coinfeção TB/HIV, casos de doença causada por cepas resistentes aos tuberculostáticos de primeira linha e populações carentes e vulneráveis; fortalecimento do sistema de saúde baseado na atenção primária; envolvimento de todos os prestadores de serviços de saúde; promoção de pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas, vacinas e estratégias diagnósticas. Como objetivo a ser alcançado estava a redução pela metade da prevalência e óbitos por TB até 2015, quando comparados às taxas de 1990 (WHO, 2010a).

Mais recentemente, para o período 2016 a 2035, foi lançado pela OMS a estratégia pelo fim da tuberculose (*End TB Strategy*) com o objetivo de reduzir a taxa de mortalidade em 90% e a taxa de incidência da doença em 80%, quando comparadas às taxas de 2015. Dentre os pilares desta estratégia estão a promoção de diagnóstico precoce, incluindo a realização universal de testes de sensibilidade; o tratamento de todos os pacientes, incluindo aqueles com TB resistente e a implementação de pesquisas e desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas (WHO, 2014a; WHO, 2017).

No Brasil, medidas de controle vêm sendo instituídas desde o início do século XX. Em 1998 foi lançado o Plano Nacional de Controle da Tuberculose, adotando a estratégia DOTS, com objetivo de aumentar o diagnóstico de casos, ampliar a cobertura de tratamento, reduzir a incidência e a mortalidade atribuída à doença (RUFFINO-NETTO, 1999). A partir do lançamento da estratégia “*End TB*”, o Ministério da Saúde também iniciou a construção do plano nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública no Brasil, que traça estratégias com o mesmo objetivo da OMS, ou seja, acabar com a tuberculose como problema de saúde pública no país até o ano de 2035. Dentre os pilares deste plano estão previstas medidas para promoção do diagnóstico precoce de todas as formas da doença, com oferta universal de cultura e testes de sensibilidade, incluindo o uso de testes rápidos para o tratamento adequado e oportuno de todos os casos diagnosticados, além do incentivo às pesquisas que visam o desenvolvimento de medidas de controle da doença (BRASIL, 2017).

Apesar dos avanços consistentes no controle da TB com todas as medidas implementadas nas últimas décadas, alguns desafios ainda persistem e impedem o efetivo controle da doença em muitos países. Dentre eles, merece destaque a resistência às drogas antituberculosas, que vem crescendo e representa um sério problema de saúde pública em vários países, inclusive no Brasil (WHO, 2017).

1.3 Resistência micobacteriana

1.3.1 Classificação da resistência micobacteriana

O fenômeno da resistência micobacteriana é observado desde o início do uso das drogas tuberculostáticas na década de 1940. Antes da terapia combinada, a

seleção de micobactérias resistentes na vigência do tratamento era uma regra, o que foi precocemente constatado com o uso da estreptomicina. Com a introdução de esquemas que incluíam a isoniazida e a rifampicina houve aumento significativo na potência do tratamento, entretanto mesmo assim ainda era possível observar isolados resistentes a uma ou mais drogas do esquema básico para o tratamento da TB (BRASIL, 2011; CROFTON; MITCHISON, 1948; MANTEN; VAN WIJNGAARDEN, 1969).

A resistência ao bacilo da TB pode ser classificada em primária ou pós-primária e conta com mecanismos distintos de gênese. A resistência primária é aquela detectada nos indivíduos sem história prévia de tratamento antituberculose, ou seja, infectados inicialmente com bacilos resistentes, e está intimamente associada à presença de indivíduos com TB resistente e bacilíferos transmitindo a doença, especialmente para contactantes susceptíveis. Já a resistência pós-primária ou adquirida é aquela detectada nos indivíduos em uso de medicamentos antituberculose ou com história prévia de tratamento por pelo menos 30 dias (BRASIL, 2011).

Outra classificação de resistência existente é aquela relacionada ao número de drogas que o *Mycobacterium tuberculosis* não é susceptível. Classifica-se como monorresistência quando é restrita a um único fármaco, polirresistência se ocorre a dois ou mais fármacos, exceto na associação de resistência a rifampicina e isoniazida, que são as duas principais drogas que compõem o esquema de primeira linha no combate à TB. Neste caso o termo utilizado é multidroga-resistência. Quando detecta-se bacilos resistentes à rifampicina, isoniazida e aos principais medicamentos de segunda linha, que são as fluoroquinolonas e os aminoglicosídeos (amicacina, capreomicina e canamicina), utiliza-se o termo resistência extensiva (XDR) (BRASIL, 2011).

O fenômeno da resistência micobacteriana pode ainda ser classificado como intrínseco ou adquirido (ALMEIDA DA SILVA; PALOMINO, 2011). A resistência intrínseca pode ocorrer devido à baixa permeabilidade da célula à droga devido à estrutura atípica de ácidos micólicos da parede micobacteriana (JARLIER; NIKAIDO, 1994). É também descrito o papel de mecanismos de efluxo para fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (DE ROSSI; AÍNSA; RICCARDI, 2006). Este tipo de resistência é relevante na medida em que limita opções terapêuticas e favorece a emergência de cepas com alto nível de resistência a drogas (NGUYEN; THOMPSON, 2006). Já a

resistência adquirida ocorre principalmente por mutações espontâneas em genes cromossômicos, levando a seleção de cepas resistentes durante a terapia. Estas mutações podem incluir mutações em um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphisms* - SNP), pequenas inserções ou deleções (*indels*) ou grandes deleções e até mesmo modificação do alvo da droga. Para a maioria dos tuberculostáticos, a frequência de mutações espontâneas ocorre a uma taxa de 10^{-9} a cada divisão celular. Esta é a principal razão da instituição de tratamento combinado para a doença, considerando-se que desta forma o risco de uma cepa conter dois perfis de mutação associados à resistência seria menor que 10^{-18} (ALMEIDA DA SILVA; PALOMINO, 2011; GILLESPIE, 2007; SAFI et al., 2008).

1.3.2 Epidemiologia da resistência micobacteriana

Os primeiros relatos de TB-MDR foram feitos há cerca de duas décadas nos Estados Unidos e na Europa, momento em que foram descritas epidemias hospitalares em portadores de SIDA (ALLAND et al., 1994). A partir de então a questão passou a receber atenção internacional, e em 1994 a OMS estabeleceu o projeto global de vigilância à resistência às drogas antituberculosas para medir a prevalência desta forma da doença (PABLOS-MÉNDEZ et al., 1998). O tratamento destes casos é mais longo, mais oneroso, menos efetivo e associado a maior ocorrência de efeitos adversos significativos (SOTGIU; MIGLIORI, 2015; WHO, 2017), devendo ser acompanhado em centros de referência e supervisionado diariamente (BRASIL, 2011).

A ocorrência de TB-XDR é um cenário ainda mais crítico, uma vez que, além da resistência às drogas de primeira linha, ocorre também resistência aos fármacos de segunda linha, reduzindo substancialmente as alternativas terapêuticas e tornando o prognóstico ainda mais reservado (BRASIL, 2011). A incidência de TB-XDR é um indicador indireto de falência na condução dos casos de TB-MDR (CHAISSON; NUERMBERGER, 2012; SHAH et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2009). Não há tratamento padronizado, tal como ocorre para os casos multirresistentes (BRASIL, 2011). Procura-se combinar medicamentos que preservam sensibilidade, com a necessidade de associação de drogas menos efetivas e, muitas vezes, com elevada toxicidade por um tempo que varia de 18 a 24 meses (CAMINERO et al., 2010).

Dados da OMS referentes ao ano de 2016 relatam 490.000 casos novos de TB-MDR. Dos casos de TB-MDR, 4,1% foram caracterizados como resistência primária enquanto que 19% como resistência adquirida. Entre os pacientes com doença resistente, o número de óbitos estimados no mesmo ano foi 240.000. Houve diagnóstico de 110.000 casos com monorresistência à rifampicina. Com relação à monorresistência a isoniazida, há dados entre 2002 e 2016 referentes a 158 países. Entre todos os casos diagnosticados da doença, a taxa média de resistência a esta droga foi de 8,5% (7,3% com resistência primária e 14% com resistência adquirida). A respeito de TB-XDR foram compilados dados provenientes de 91 países, que descrevem que, entre os casos diagnosticados de TB-MDR, 6,2% apresentavam perfil de resistência extensiva. Os países com maiores taxas de isolados resistentes foram China, Índia e Rússia, perfazendo 47% do total de casos (WHO, 2017).

No Brasil, em 2016, foram diagnosticados 1.044 casos com resistência a medicamentos. Destes, 700 foram classificados como resistência primária e 344 eram casos de retratamento (recidiva ou reingresso após abandono). Considerando-se apenas os casos que iniciaram o tratamento específico para doença resistente, 193 (25,7%) eram multidroga-resistentes (BRASIL, 2017).

Apesar dos esforços para otimização do diagnóstico da resistência a drogas antituberculose, os casos de resistência bacilar ainda são pouco diagnosticados e, consequentemente, há baixas taxas de tratamento adequado, o que ameaça o controle da doença. Certamente, uma das principais causas do subdiagnóstico é a falta de disponibilidade de testes de sensibilidade em muitas regiões (KRITSKI, 2010; WHO, 2017).

1.3.3 Fatores de risco para resistência bacilar

As situações de risco para resistência incluem: antecedente de tratamento para TB, que é caracterizado por tratamento administrado por pelo menos 30 dias ou falência terapêutica, definida pela persistência da positividade do escarro ao final do tratamento ou situações de escarros fortemente positivos no início do tratamento com manutenção desta situação no quarto mês ou ainda positividade inicial da baciloscopia seguida de negativação e nova positividade por dois meses consecutivos, a partir do quarto mês de tratamento. Além destas situações cita-se também os contatos de casos de TB-MDR, imunodeprimidos, profissionais de saúde,

população de rua, população penitenciária, moradores de instituição de longa permanência e população indígena (BRASIL, 2011).

1.3.4 Mecanismos de ação e resistência de tuberculostáticos

O esquema de primeira linha para tratamento de TB é composto por uma fase intensiva que prevê o uso de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol por dois meses e por uma fase de manutenção com o uso de rifampicina e isoniazida por quatro meses ou por sete meses em caso de acometimento de sistema nervoso central e osteomuscular. As drogas alternativas mais frequentemente utilizadas na impossibilidade do uso do esquema de primeira linha são os aminoglicosídeos e as fluoroquinolonas (BRASIL, 2011; WHO, 2010b). Conforme mencionado, apesar do tratamento ser efetivo para cura bacteriológica, o avanço da doença persiste aliado ao aumento de detecção de resistência bacilar, que muitas vezes ocorre devido a casos de tratamentos incompletos, dado sua duração prolongada e toxicidade dos medicamentos, ou ainda a casos de retratamentos por novos episódios da doença (BRASIL, 2011; WHO, 2017).

O uso da isoniazida está recomendado não somente no esquema de primeira linha do tratamento, como também em esquemas de tratamento de TB latente, ou seja, tratamento profilático em pacientes de maior risco para desenvolvimento da doença. Desta forma, a exposição à droga é consideravelmente maior (BRASIL, 2011; WHO, 2011b). A isoniazida é uma droga com alta atividade bactericida e excelente penetração intracelular. Com relação ao seu mecanismo de ação, a droga é administrada na forma de uma pró-droga que penetra no citoplasma da micobactéria por difusão, sendo capaz de atuar apenas em microrganismos em processo ativo de replicação, não atuando durante a fase estacionária de crescimento. Para sua atividade, é necessária a conversão em droga ativa através da enzima catalase-peroxidase, codificada pelo gene *katG* (ZHANG; HEYM; ALLEN, 1992). Quando em atividade, interfere na síntese de ácidos micólicos essenciais ao inibir NADH-enoil-ACP-redutase, que é codificada pelo gene *inhA* ou a beta-cetoacil ACP sintetase, codificada pelo gene *kasA* (MDLULI et al., 1998; RAWAT; WHITTY; TONGE, 2003). Diferentes mutações estão associadas à resistência a esta droga, sendo as principais aquelas presentes nos genes *katG*, *inhA*, *kasA* e *ahpC* (ALMEIDA DA SILVA; PALOMINO, 2011). A redução ou perda total da atividade da

catalase-peroxidase como resultado de mutações no gene *katG* é a alteração genética mais comum associada à resistência à isoniazida. Apesar de já descritas mais de 100 mutações associadas a este gene, a mais comum é a S315T (ZHANG et al., 1992). Geralmente as mutações no gene *katG* causam resistência de alto nível, enquanto que aquelas no *inhA* e *kasA* resultam em resistência de baixo nível (JACOBSON et al., 2011; UNISSA et al., 2016).

O alvo da rifampicina no *M. tuberculosis* é a subunidade beta da RNA polimerase. Ao se ligar, inibe a elongação do RNA mensageiro. Esta droga atua não somente em bacilos com replicação ativa, mas também naqueles em período estacionário de crescimento (BLANCHARD, 1996). A maioria dos isolados resistentes a esta droga possuem mutações no gene *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase. Assim, há uma mudança conformacional que determina baixa afinidade à droga e consequentemente o desenvolvimento de resistência (TELENTI et al., 1993). Em 96% dos casos de resistência, a mutação se localiza em uma região de 81 pares de bases, entre os códons 507 a 533 do gene *rpoB*. Esta região é denominada região determinante de resistência a rifampicina (RRDR) (RAMASWAMY; MUSSER, 1998). Pode haver resistência cruzada entre a rifampicina e outras rifamicinas, no entanto algumas mutações nos códons 516, 518, 522, 529 e 533 estão associadas com baixo nível de resistência a rifampicina e sensibilidade a rifabutina (CAVUSOGLU; KARACA-DERICI; BILGIC, 2004; JAMIESON et al., 2014). Também deve ser mencionado que diferentes mutações resultam em diferentes níveis de resistência (HEEP et al., 1999). A maioria das cepas resistentes a rifampicina são também resistentes a outras drogas, principalmente à isoniazida. Esta é a justificativa para considerar a resistência a rifampicina como indicador de TB-MDR (TRAORE et al., 2000).

A pirazinamida tem como característica atuar sobre bacilos dormentes em ambientes ácidos e em condições de baixa tensão de oxigênio (meio intracelular ou interior dos granulomas). Trata-se de um análogo estrutural da nicotinamida administrado na forma de uma pró-droga que precisa ser convertido na sua forma ativa, denominada ácido pirazinoico, pela enzima pirazinamidase/nicotinamidase (PZase) para exercer ação terapêutica. Esta enzima é codificada pelo gene *pncA*. Postula-se que o mecanismo de ação da droga seja pela ruptura da membrana celular, inibindo o transporte transmembrana. Mutações no gene *pncA* são as mais

associadas à resistência a esta droga (ZHANG et al., 2003; ZHANG; MITCHISON, 2003).

Etambutol é ativo contra bacilos em multiplicação ativa. Tem como mecanismo de ação a interferência na biossíntese da parede celular do *M. tuberculosis*, já que atua sobre membros do gene *embCAB*, que codifica a arabinofuranosil transferase, envolvida na síntese de componentes da parede celular. (TAKAYAMA et al., 1979). A maioria das mutações associadas à resistência está localizada no gene *embB*, especificamente no códon 306. No entanto, há divergência no papel de várias mutações localizadas nesta região genômica, sendo ainda controverso o seu real papel na resistência ao etambutol (SAFI et al., 2008).

A estreptomicina foi a primeira droga utilizada no tratamento da TB. Atua sobre a síntese proteica através da ligação à subunidade 16S do RNA ribossômico. Mutações na proteína ribossomal S12 codificada pelo gene *rpsL* estão associadas a resistência. Tais mutações alteram a estrutura terciária da subunidade 16S do RNA ribossômico, levando a redução da afinidade da droga e alto nível de resistência. Já mutações no gene *rrs*, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico, estão associadas a moderados níveis de resistência e aquelas no *gidB* conferem baixos níveis de resistência (JAGIELSKI et al., 2014; SPRINGER et al., 2001; TUDÓ et al., 2010; WONG et al., 2011). A maioria das mutações associadas à resistência ocorrem no gene *rpsL*, sendo a K43R a mais comum (GILLESPIE, 2002).

Fluoroquinolonas são antibióticos bactericidas que atuam sobre a topoisomerase II (DNA girase). Esta enzima é um tetrâmero composto por duas subunidades A e duas subunidades B codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente, que tem a função de catalisar o espiralamento do DNA (TAKIFF et al., 1994). A maioria das mutações associadas à resistência a esta droga estão localizadas em uma região conservada do gene *gyrA*, sendo as posições Ala-90 e Asp-94 as mais frequentemente mutadas (SUN et al., 2008).

Embora mutações distintas em diferentes genes estejam associadas à resistência a drogas, há diversas cepas fenotipicamente resistentes que não apresentam as mutações clássicas. Do ponto de vista clínico, a partir da melhor compreensão dos mecanismos de resistência, é fundamental o desenvolvimento e utilização de testes diagnósticos de sensibilidade acurados, simples, rápidos e baratos (ALMEIDA DA SILVA; PALOMINO, 2011). Até o momento, os testes moleculares rápidos para detecção de resistência apresentam elevada sensibilidade

apenas para avaliação de mutações associadas à rifampicina e isoniazida (NEBENZAHL-GUIMARAES et al., 2014).

1.4 Testes de sensibilidade aos tuberculostáticos

Desde que o avanço da resistência micobacteriana é uma das principais ameaças ao controle da TB, a melhoria de estratégias diagnósticas para a detecção de resistência aos tuberculostáticos é uma das prioridades da OMS (WHO, 2010a; WHO, 2017).

Atualmente são endossados pela OMS testes de sensibilidade qualitativos baseados em meios de cultura sólidos ou líquidos, denominados fenotípicos; além de testes moleculares, tais como Xpert MTB/RIF, realizado em sistema automatizado e “*line probe assays*” (LPA), realizados em fitas (WHO, 2017).

Os testes fenotípicos avaliam o crescimento do microrganismo na presença do antibiótico em teste e, como mencionado, podem ser realizados em meios de cultura sólido ou líquido. Vários métodos foram descritos em diversos sistemas comerciais e não comerciais. No entanto, o método das proporções é geralmente considerado como teste de referência (DOMINGUEZ et al., 2016; PIERSIMONI et al., 2006). Este teste baseia-se na premissa de que menos de 1% de microrganismos em uma população de micobactérias são resistentes a uma droga em uma concentração crítica (menor concentração capaz de inibir mais de 95% das cepas sensíveis). Desta forma, se mais que 1% de microrganismos é resistente, a população pode ser considerada resistente àquela droga (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2011). Os microrganismos devem ser inoculados em meios sem a presença da droga e em outros contendo concentração fixa da droga. Após a incubação, o número de colônias em cada tubo é comparado para avaliação da proporção de colônias resistentes. Em meios líquidos, caso haja detecção de crescimento primeiro no tubo sem a presença da droga, a população é considerada sensível àquela droga (DOMINGUEZ et al., 2016; WHO, 2008b). Os resultados usando as concentrações críticas atualmente preconizadas são geralmente acurados e reprodutíveis para rifampicina e isoniazida. Também são adequadas para fluoroquinolonas e aminoglicosídeos de segunda linha, porém com menor nível de evidência. São menos reprodutíveis para etambutol e estreptomicina (DOMINGUEZ et al., 2016; HORNE et al., 2013). Os testes para

avaliação de sensibilidade à pirazinamida são tecnicamente difíceis, dado sua atividade em ambientes ácidos, o que dificulta o crescimento micobacteriano (CHANG; YEW; ZHANG, 2013).

Uma característica a ser considerada para interpretação dos resultados de métodos fenotípicos é a concentração crítica adotada, que prevê a distinção clara entre a população resistente e a sensível. Caso a concentração inibitória mínima (MIC) dos microrganismos sensíveis e resistentes estejam muito próximas, o uso da concentração crítica para classificação de resistência torna-se problemático (BOTTGER, 2011). A proporção de cepas com diferentes MICs presentes na comunidade também afeta a acurácia do teste, dificultando a detecção de cepas com baixo nível de resistência (VAN DEUN et al., 2013). Além destas considerações, deve também ser mencionado que estes testes podem levar até seis a oito semanas para liberação dos resultados, já que são de mais difícil execução e não estão amplamente distribuídos. Sua utilização exclusiva impacta em prolongamento de tratamentos inapropriados, maior risco de transmissão de cepas resistentes e, eventualmente, piora do perfil de resistência (BRASIL, 2011; LANGE et al., 2014; WHO, 2008a).

Considerando-se esta deficiência, o desenvolvimento e aplicação de estratégias para acesso a um diagnóstico rápido e efetivo destes casos têm recebido grande atenção internacional (KESHAVJEE; FARMER, 2012; NICOLAU et al., 2012). Neste sentido, destaca-se os testes moleculares para detecção de resistência aos tuberculostáticos. Trata-se de testes de fácil execução e resultados obtidos em menor espaço de tempo quando comparados aos métodos fenotípicos, baseados na premissa de que a resistência micobacteriana ocorre devido a mutações em diferentes nucleotídeos (BOTTGER, 2011; WHO, 2008a; WHO, 2017).

O teste Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience, GmbH, Germany) é um LPA que está aprovado para uso em espécimes com crescimento em meios de cultura sólidos ou líquidos e também para execução diretamente de amostras pulmonares. É capaz de identificar o complexo *M. tuberculosis*, além de detectar resistência à rifampicina e isoniazida. Com relação à rifampicina, identifica as mutações mais frequentes no gene *rpoB*, localizadas na região RRDR, que engloba mais de 95% das mutações associadas à resistência a esta droga. Sobre resistência à isoniazida, são investigadas mutações no códon 315 do gene *KatG*, responsáveis por 60 a 80% dos casos de resistência em alto nível e em 3 posições (-16, -15 e -8) no gene *inhA*,

que conferem resistência de baixo nível em 10 a 20% dos isolados resistentes a esta droga (MIOTTO, 2008; WHO, 2008a).

Outro LPA desenvolvido foi o Genotype MTBDRsl (Hain Lifescience, GmbH, Germany). Sua primeira versão (1.0) possibilitava o diagnóstico de resistência às fluoroquinolonas (ofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino), aminoglicosídeos de segunda linha (amicacina, canamicina e capreomicina) e ao etambutol. A resistência às fluoroquinolonas era investigada através da avaliação de regiões localizadas nos códons 85 a 96 do gene *gyrA*. Mutações neste gene englobam 70% das cepas resistentes a esta droga, no entanto podem não refletir resistência às drogas de nova geração, como moxifloxacino. Para avaliação de resistência aos aminoglicosídeos de segunda linha eram avaliados os códons 1401, 1402 e 1484 do gene *rrs*, que contêm mutações associadas a diferentes fenótipos de resistência. Resistência ao etambutol era investigada através do códon 306 do gene *embB*, já que mutações neste códon estão associadas a 55% das cepas resistentes. (BROSSIER et al., 2010; HILLEMANN; RUSCH-GERDES; RICHTER, 2009; MIOTTO et al., 2012). Este teste foi substituído pela versão 2.0, que possibilita o diagnóstico de resistência às fluoroquinolonas e aminoglicosídeos de segunda linha e está aprovado para realização a partir de espécimes pulmonares, mesmo com baciloscopia negativa, ou a partir de isolados de meios de cultura. Nesta versão, foi acrescentada a avaliação de mutações nos códons 538 e 540 do gene *gyrB*, que também podem conferir resistência às fluoroquinolonas e nas posições -37, -14, -12, -10 e -2 do gene *eis*, associadas a resistência de baixo nível à canamicina; o que aumentou a sensibilidade do teste. Nesta versão não é mais avaliada resistência ao etambutol (THERON et al., 2016).

O teste Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) é um teste rápido molecular realizado em cartuchos que simultaneamente disponibiliza o diagnóstico de TB pela realização de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real e o perfil de sensibilidade à rifampicina em 2 horas. Trata-se de um teste automatizado de fácil execução, que pode ser realizado diretamente a partir de amostras de escarro. O perfil de resistência à rifampicina é baseado em detecções de mutações na região RRDR do gene *rpoB* (MC ALISTER; DRISCOLL; METCHOCK, 2015; STEINGART et al., 2013; WHO, 2011a).

Os testes moleculares detectam tanto microrganismos viáveis quanto inviáveis. Desta forma, não devem ser utilizados para monitoramento da resposta ao

tratamento, já que resultados positivos não implicam necessariamente em atividade da doença (FRIEDRICH et al., 2013).

Os testes fenotípicos ainda são considerados como padrão ouro para detecção de resistência a drogas. No entanto, é importante mencionar que cepas de *M. tuberculosis* passam por processo de evolução durante o tratamento e, sendo esta micro-evolução dinâmica, leva a presença de diferentes subpopulações com diferentes perfis de mutações associadas à resistência. Esta diversidade em cada paciente pode influenciar o desempenho tanto dos testes fenotípicos quanto dos moleculares, devendo ser considerada na interpretação dos resultados que podem não corresponder à resistência clínica (DOMINGUEZ et al., 2016; SUN et al., 2012). Incremento na acurácia dos métodos fenotípicos poderia ocorrer se diferentes concentrações de drogas fossem avaliadas isoladamente, com o intuito de quantificar níveis de resistência (CAMBAU et al., 2015).

A falha na detecção de resistência por testes moleculares pode ocorrer devido à baixa concentração de material genético na amostra, como ocorre na avaliação de amostras com baciloscopia negativa ou quando mutações associadas à resistência estão localizadas em regiões do genoma que não são avaliadas pelo teste, fato que contribui para diferenças geográficas de sensibilidade de cada teste (BARNARD, 2008; HOSHIDE et al., 2014). Detecções inapropriadas de resistências podem ocorrer na presença de mutações silenciosas na região avaliada, ou seja, não há modificação de proteínas codificadas e, conseqüentemente, não há relação da mutação com a resistência fenotípica (MOKADDAS et al., 2015).

Desta forma, é válido mencionar a possibilidade de resultados discrepantes entre testes fenotípicos e moleculares, o que pode levar a condutas inapropriadas, seja na manutenção de esquema de primeira linha em casos de doença resistente a drogas ou no uso de tratamentos de segunda linha com maior potencial de toxicidade e maior duração em pacientes com doença sensível aos principais fármacos (DOMINGUEZ et al., 2016).

Também está claro que, embora a maioria dos genes associados à resistência a drogas já esteja identificado, a compreensão da resistência bacilar a nível genético permanece incompleta, o que prejudica a aplicação e interpretação de testes moleculares (LIN; DESMOND, 2014). Métodos acurados para detecção da diversidade genômica do *M. tuberculosis* são cruciais para avaliação não só da

implementação de novas estratégias diagnósticas mais precisas, como também para avaliação de novas drogas e vacinas (NIEMANN et al., 2009).

1.5 Estudo do genoma do *Mycobacterium tuberculosis*

1.5.1 Técnicas de tipagem molecular

As espécies pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* englobam cepas geneticamente distintas, originando várias linhagens filogenéticas associadas a diferentes características relacionadas à virulência, manifestações clínicas e resistência a drogas (GAGNEUX; SMALL, 2007; THWAITES et al., 2008). Apesar disto, seu genoma é caracterizado por pequena diversidade de sequências de DNA, o que as classifica como patógenos geneticamente monomórficos. O estudo genômico destes microrganismos é, portanto, um desafio que exige métodos altamente discriminatórios baseados na avaliação de seus elementos móveis e repetidos (ACHTMAN, 2008; NIEMANN et al., 2009).

Neste sentido, nas últimas décadas vem sendo aplicadas para estudo deste patógeno técnicas de tipagem molecular baseadas na identificação destes elementos genômicos, tais como RFLP IS6110, *Spoligotyping* e MIRU-VNTR.

RFLP (*restriction-fragment-length polymorphism*) analisa a distribuição da sequência de inserção IS6110 em diferentes cepas obtidas através de cultivo, com alto poder discriminatório, porém com exigência de elevada quantidade de DNA de alta qualidade e procedimentos complexos (JOSEPH et al., 2013).

MIRU-VNTR (*mycobacterial interspersed repeat units - variable number of tandem repeat*) é técnica de tipagem baseada na característica do genoma do *M. tuberculosis* de possuir sequências genômicas intercaladas e repetidas. Também possui alto poder discriminatório, sendo tecnicamente mais simples que a RFLP e realizado em equipamento automatizado. Técnicas atuais avaliam 15 ou 24 loci (BARNES; CAVE, 2003; SUPPLY et al., 2006).

A técnica *Spoligotyping* (*spacer oligonucleotide typing*) é baseada na análise do polimorfismo da região repetida direta DR, que está presente exclusivamente nas espécies do complexo *M. tuberculosis*. Possui menor poder discriminatório e menor resolução, porém é de mais fácil execução que as técnicas descritas anteriormente e exige quantidade menor de DNA (KREMER et al., 1999).

1.5.2 Sequenciamento genômico total

A primeira publicação sobre sequenciamento genômico total do *M. tuberculosis* foi em 1998, quando foi sequenciado o genoma da cepa de referência H37Rv (COLE et al., 1998). Este evento significou um enorme avanço nas pesquisas genômicas, possibilitando melhor entendimento da biologia, metabolismo, imunologia e evolução deste patógeno (ILINA et al., 2013).

No que concerne ao estudo da resistência, o sequenciamento genômico apresenta grande poder discriminatório, podendo fornecer informações muito mais acuradas que as técnicas descritas anteriormente, além da descrição de novas mutações e avaliação de resistência a uma ampla gama de tuberculostáticos, não avaliados pelos outros testes de sensibilidade comerciais. É possível a avaliação de diversos polimorfismos genéticos, incluindo polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), além de pequenas inserções e deleções (indels) potencialmente importantes para predição confiável de sensibilidade a drogas (PANKHURST et al., 2016; WALKER et al., 2015; WITNEY et al., 2015). O desenvolvimento de tecnologias de nova geração reduziu os custos e o tempo necessário para a técnica, tornando-a progressivamente mais acessível (METZKER, 2010).

As técnicas em uso atual requerem a utilização de isolados que apresentaram crescimento em meio de cultura (WALKER et al., 2015), entretanto vem sendo descritas técnicas realizadas diretamente de amostras clínicas, com grande potencial para reduzir o tempo para obtenção de resultados e consequentemente possibilitar definição terapêutica personalizada (BROWN et al., 2015; DOMINGUEZ et al., 2016).

Tendo em vista a imensa quantidade de informação gerada, a interpretação dos dados requer a utilização de plataformas de bioinformática específicas e de fácil manejo (DOMINGUEZ et al., 2016). É fundamental a distinção, nos genes associados à resistência a drogas, de polimorfismos que verdadeiramente conferem resistência daqueles definidores de linhagem ou variações filogenéticas, sem associação com resistência (FEUERRIEGEL et al., 2014). Estes polimorfismos podem também ser classificados como SNPs sinônimos e não sinônimos, sendo que os sinônimos são geralmente classificados erroneamente como marcadores de resistência. Entretanto, ainda há necessidade de desenvolvimento e padronização de plataformas robustas de análise para que a distinção destes polimorfismos e o

desempenho do sequenciamento possam ser otimizados. Desta forma, o aprimoramento da avaliação de dados também requer a validação e constante atualização de bases de dados contendo informações sobre mutações associadas à resistência, especificadas como resistência de alto ou baixo nível. Para atingir estes objetivos, é fundamental a realização de pesquisas adicionais sobre mecanismos moleculares de resistência que envolvam o estudo de grande número de isolados provenientes de diferentes regiões geográficas, contemplando diversas linhagens do *M. tuberculosis* (PAPAVENTSIS et al., 2017).

Finalmente, outro desafio a ser superado para difundir o uso sistemático do sequenciamento genômico diz respeito à falta de correlação das informações geradas com dados clínicos (DOMINGUEZ et al., 2016). Para superá-lo seria fundamental o delineamento de estudos que envolvessem comparação dos resultados obtidos com tratamentos implementados e resposta clínica dos pacientes (PAPAVENTSIS et al., 2017).

O avanço de estudos genômicos, seguido da otimização e aprimoramento das plataformas de análises de dados futuramente possibilitará o desenvolvimento e uso sistemático de estratégias diagnósticas da resistência micobacteriana mais acuradas, completas e rápidas. Assim, ocorrerão avanços subsequentes no oferecimento de tratamento efetivo em menor espaço de tempo, o que contribuirá para redução da transmissão de cepas resistentes na comunidade (WHO, 2014b).

2 Justificativa

O avanço da resistência do *M. tuberculosis* impacta negativamente no controle da doença. Há, portanto, necessidade da otimização e ampliação da capacidade diagnóstica de sensibilidade aos fármacos anti-TB, a partir do desenvolvimento e aprimoramento de técnicas acuradas, simples e rápidas, capazes de antecipar o início do tratamento correto e reduzir a transmissão de cepas resistentes. Estudos genômicos, sobretudo aqueles envolvendo sequenciamento genômico total, têm grande potencial para auxiliar na adequada compreensão das mutações associadas à resistência bacilar e consequentemente possibilitar a implementação de estratégias diagnósticas de resistência mais precisas. Certamente, um dos grandes desafios para este avanço é o estabelecimento de correlações entre as informações genômicas geradas e a repercussão clínica da resistência (DOMINGUEZ et al., 2016; NIEMANN et al., 2009; WHO, 2014b).

Este estudo justifica-se pela avaliação de resistência de isolados de *M. tuberculosis* pelo método fenotípico, técnicas moleculares rápidas e pelo sequenciamento genômico total, aliado a informações sobre tratamento e desfecho clínico dos casos, buscando contribuir para o conhecimento dos complexos mecanismos moleculares da resistência micobacteriana.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracterizar as mutações gênicas de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes com TB resistente a drogas de primeira e/ou segunda linha da região sudeste do Brasil e da região central de Moçambique através do sequenciamento genômico total.

3.2 Objetivos específicos

3.2.2 Descrever o perfil de sensibilidade e padrões de mutações dos isolados através dos testes Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience, GmbH, Germany), Genotype MTBDRsl (Hain Lifescience, GmbH, Germany) e Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA).

3.2.3 Comparar os perfis de resistência aos tuberculostáticos encontrados no teste de sensibilidade fenotípico BACTEC MGIT 960 com o perfil de mutações detectadas nos testes de sensibilidade comerciais genotípicos e no sequenciamento genômico total.

4 Materiais e Métodos

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de estudo descritivo e transversal.

4.2 Local do estudo

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas (HC) FMRP-USP e no Centro de Medicina Genômica do HC FMRP-USP. Os isolados analisados foram submetidos aos testes fenotípico, molecular rápido e LPAs no laboratório de micobactérias do HC, onde também foi realizada a extração de DNA. Já o sequenciamento genômico total foi realizado no Centro de Medicina Genômica do HC FMRP-USP.

4.3 Seleção da amostra

Os isolados analisados foram obtidos de pacientes provenientes de dois centros: Hospital das Clínicas da FMRP-USP e Hospital Central da Beira na província de Sofala, Moçambique. Todas as amostras clínicas foram coletadas por ocasião da investigação diagnóstica rotineira de TB, segundo indicação da equipe médica que acompanhou cada paciente, sendo posteriormente armazenadas no laboratório de pesquisa de micobactérias do HC FMRP-USP. Os isolados provenientes de Moçambique foram disponibilizados devido à parceria de pesquisa firmada entre as duas instituições.

Foram considerados elegíveis para o estudo todos os isolados de *M. tuberculosis* submetidos aos testes de sensibilidade Genotype MTBDRplus, Genotype MTBDRsl (Hain Lifescience, GmbH, Germany), Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), além do teste fenotípico não radiométrico em meio líquido BACTEC MGIT 960 SIRE (MGIT 960; Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) e que apresentaram resistência a pelo menos uma droga em pelo menos um destes testes entre os anos de 2013 a 2016.

Pelos critérios de inclusão estipulados, foram inicialmente incluídas 35 amostras provenientes de Moçambique e 26 provenientes do Brasil. Deste total, 22 isolados de Moçambique e 9 do Brasil foram excluídas durante o processamento do

sequenciamento genômico, por má qualidade das bibliotecas geradas. Assim, foram incluídos no estudo 30 isolados, sendo 13 de Moçambique e 17 do Brasil.

4.4 Obtenção dos dados

4.4.1 Teste Genotype MTBDRplus

Os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade Genotype MTBDRplus versão 2.0 (Hain Lifescience, GmbH, Germany), aprovado pela OMS (WHO, 2017). Trata-se de teste genotípico que identifica micobactérias do complexo *M. tuberculosis* e detecta mutações que conferem resistência à rifampicina e isoniazida. A identificação de resistência à rifampicina é determinada pela detecção de mutações no gene *rpoB*. Quanto à resistência à isoniazida, são avaliadas mutações no gene *KatG*, que conferem resistência à isoniazida em alto nível e no gene *inhA*, que conferem resistência à isoniazida em baixo nível. O procedimento envolve a extração, amplificação multiplex com *primers* biotinilados e hibridização reversa do DNA. O resultado é determinado e interpretado em uma fita, que identifica a presença de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* quando há positividade da banda TUB. Como controles de qualidade, a fita possui as seguintes bandas: controle do conjugado (CC), controle da amplificação (AC) e controle de loci (*rpoB*, *KatG* e *inhA*). A fita também é composta por sondas do tipo selvagem (WT), que incluem as áreas de resistência mais importantes dos referidos genes (*rpoB* WT 1 a 8, *KatG* WT, *inhA* WT1 e 2). Se presentes, excluem mutações detectáveis nos genes avaliados. Outros componentes da fita são as bandas que detectam algumas das mutações mais comuns associadas a resistência (Figura 1). Para interpretação, a fita deve ser comparada com uma fita de avaliação fornecida pelo fabricante (Figura 2) (HAIN LIFESCIENCE, 2012).

Figura 1 - Mutações nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* detectadas

	Códon	Mutação
<i>rpoB</i> WT1	505-509	F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513	L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517	Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1 D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522	del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525	S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3 S531L S531Q* S531W L533P

	Códon	Mutação
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2 S315T1 S315T2

	Códon	Mutação
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1 <i>inhA</i> MUT2 C15T A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A <i>inhA</i> MUT3B T8C T8A

Fonte: Adaptado de Hain Lifescience, 2012.

Figura 2 - Modelo esquemático da fita de interpretação dos resultados do teste Genotype MTBDRplus

Fonte: Hain Lifescience, 2012.

4.4.2 Teste Genotype MTBDRsl

Todos os isolados também foram submetidos ao teste de sensibilidade Genotype MTBDRsl versão 2.0 (Hain Lifescience, GmbH, Germany) aprovado pela OMS (WHO, 2017). É um teste genotípico identifica micobactérias do complexo *M. tuberculosis* e detecta mutações que conferem resistência às fluoroquinolonas (ofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino) e aminoglicosídeos de segunda linha (amicacina, canamicina e capreomicina). A resistência às fluoroquinolonas é investigada através da avaliação de regiões localizadas nos genes *gyrA* e *gyrB*. Para avaliação de resistência aos aminoglicosídeos de segunda linha são avaliadas mutações do gene *rrs* e no gene *eis*, sendo as mutações neste último gene associadas à resistência de baixo nível à canamicina (Figura 3). A metodologia deste teste é semelhante à descrita para o Genotype MTBDRplus e o resultado também é apresentado em uma fita, que deve ser comparada a uma fita de avaliação fornecida pelo fabricante (Figura 4) (HAIN LIFESCIENCE, 2015).

Figura 3 - Mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *rrs* e *eis* detectadas

		Mutação
<i>gyrA</i> WT1	-	G88A
	-	G88C
<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> MUT1	A90V
	<i>gyrA</i> MUT2	S91P
<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A
	<i>gyrA</i> MUT3B	D94N
	<i>gyrA</i> MUT3B	D94Y
	<i>gyrA</i> MUT3C	D94G
	<i>gyrA</i> MUT3D	D94H ¹¹
<i>gyrB</i> WT	<i>gyrB</i> MUT1	N538D
	<i>gyrB</i> MUT2	E540V

	Posição		Mutação
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G
	1402	-	C1402T
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T

		Mutação
<i>eis</i> WT1	-	G-37T
	<i>eis</i> MUT1	C-14T
<i>eis</i> WT2	-	C-12T
	-	G-10A
<i>eis</i> WT3	-	C-2A

Fonte: Adaptado de Hain Lifescience, 2015.

Figura 4 - Modelo esquemático da fita de interpretação dos resultados do teste Genotype MTBDRsl

Fonte: Hain Lifescience, 2015.

4.4.3 Teste Xpert MTB/RIF

O teste molecular rápido, Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), é aprovado pela OMS (WHO, 2017) e também foi implementado pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2017). Trata-se de um teste comercial com tecnologia de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real realizado em cartuchos em plataforma automatizada, que integra os processos de preparo da amostra, amplificação e detecção. É aprovado para realização diretamente a partir de amostras de escarro. No período de duas horas disponibiliza simultaneamente o diagnóstico de TB e o perfil de sensibilidade à rifampicina pela detecção de mutações na região RRDR do gene *rpoB*. Marcadores moleculares com fluoróforos são usados para detectar hidridização de cada umas das cinco regiões alvo do gene amplificadas. Há três passos manuais na metodologia do teste: acréscimo de reagente na amostra para liquefazer e inativar os microrganismos, transferência do escarro liquefeito para o cartucho e o carregamento do cartucho no dispositivo.

Todas as outras etapas são automatizadas. Os cartuchos são pré carregados com os reagentes necessário para o processamento da amostra, extração de DNA, amplificação e detecção por laser dos alvos dos marcadores moleculares (WHO, 2011a).

4.4.4 Teste BACTEC MGIT 960 SIRE

O teste fenotípico utilizado foi o BACTEC MGIT 960 SIRE (MGIT 960; Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD). Trata-se de ensaio qualitativo não radiométrico em meio de cultura líquido para teste de sensibilidade do *M. tuberculosis* à estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol utilizando os sistemas BD BACTEC MGIT 960 e BD BACTEC MGIT 320. Por ser não radiométrico, pode possibilitar a obtenção mais precoce de resultados do que o método das proporções, em média entre 4 a 13 dias. Permite a avaliação de sensibilidade na concentração crítica para as quatro drogas testadas e em uma concentração superior para a estreptomicina, isoniazida e etambutol, que é recomendada pelo fabricante caso haja resistência detectada em concentrações críticas. O método baseia-se na comparação de crescimento micobacteriano em tubo contendo um fármaco com outro sem o fármaco. O tubo indicador do crescimento de micobactérias BD BBL MGIT contém o meio líquido middlebrook 7H9, que sustenta o crescimento e o isolamento de micobactérias e um composto fluorescente envolvido em silicone sensível à presença de oxigênio dissolvido no caldo. A concentração inicial de oxigênio dissolvido atenua a emissão proveniente do composto, tornando possível detectar um reduzido grau de fluorescência. Subsequentemente, microrganismos com respiração ativa consomem oxigênio, o que permite que o composto desenvolva fluorescência, que é monitorizada pelo instrumento BD BACTEC MGIT. A análise da fluorescência no tubo contendo fármaco, comparativamente com a fluorescência presente no tubo de controle de crescimento, é usada para determinar os resultados da sensibilidade. O instrumento interpreta automaticamente estes resultados utilizando algoritmos pré-definidos (que comparam o crescimento no tubo com o fármaco com o crescimento no tubo de controle do crescimento), efetuando o relatório do resultado de sensibilidade ou de resistência. As concentrações críticas das drogas avaliadas seguiram a recomendação do fabricante, ou seja, isoniazida 0,10 g/mL; rifampicina 1,0g/mL;

etambutol 5,0g/mL e estreptomicina 1,0g/mL (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2016).

4.4.5 Sequenciamento genômico total

Para a realização do sequenciamento genômico total, a extração de DNA foi feita pela técnica CTAB (brometo de cetil trimetilamonio), utilizando solução de CTAB 10% (LAERSEN et al., 2007) . A análise de qualidade do DNA genômico foi feita através de espectrofotometria, obedecendo-se à relação 260/280 de 1,8 a 2 e a visualização da integridade do DNA genômico em gel de agarose.

O sequenciamento total do genoma foi realizado no equipamento Illumina MiSeq Sequencing System (Illumina, San Diego, CA, USA) no Centro de Medicina Genômica. A metodologia do sequenciamento prevê inicialmente a montagem da biblioteca (conjunto de pequenos fragmentos de DNA de tamanhos variados, entre 150-500 pares de bases) a ser sequenciada. As bibliotecas de DNA foram preparadas com o *kit Nextera DNA Sample Prep* (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). O DNA genômico foi quantificado por método fluorimétrico (Qubit) e 50ng de DNA de cada amostra foram utilizados na preparação das bibliotecas, seguindo as instruções do fabricante. Após a quantificação, o DNA genômico é “tagmentado” por transposons, havendo simultaneamente a fragmentação do DNA genômico e adição de sequências de adaptadores nas extremidades.

O passo seguinte visa a amplificação por PCR da biblioteca. A biblioteca então é quantificada e para isso recomenda-se, além da quantificação fluorimétrica, uma quantificação absoluta por PCR em tempo real, utilizando-se o kit comercial KAPA SYBR FAST (KAPA Biosystems). Após a quantificação precisa, as bibliotecas serão diluídas, desnaturadas e clusterizadas em uma *flow cell*, que é o suporte sólido da reação. Durante a geração dos clusters, cada fragmento de cDNA das bibliotecas é incorporado à superfície da *flow cell*, que está coberta com oligonucleotídeos complementares aos adaptadores, usados para amplificar o cDNA de forma isotérmica, dando origem aos clusters, ou seja, grupos ou colônias de fragmentos ligados à *flow cell*. Essa complementariedade permite a hibridação e imobilização dos fragmentos na lâmina e posterior amplificação por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) em ponte (“bridge PCR”).

Após a biblioteca estar pronta e ligada à *flow cell*, o sequenciamento é iniciado. A tecnologia SBS (“*Sequencing-by-Synthesis*”) permite a leitura simultânea da sequência de nucleotídeos de milhões de fragmentos de DNA. Esta tecnologia baseia-se na terminação (clivagem do nucleotídeo marcado já detectado que possibilita a adição do próximo nucleotídeo) da síntese da cadeia de DNA após a detecção do sinal fluorescente. Os eventos de incorporação e clivagem do nucleotídeo marcado e modificado ocorrem sucessivas vezes, permitindo, desta forma, a leitura base a base e ao mesmo tempo elimina possíveis erros em sequências com repetições da mesma base (regiões homopoliméricas) (ILLUMINA SUPPORT CENTER, 2017).

4.4.6 Análise de bioinformática

Após o sequenciamento, as leituras geradas foram verificadas quanto a qualidade, utilizando o programa FastQC. As *reads* que não estiveram com boa qualidade foram trimadas utilizando o programa PRINSEQ v0.20.4. Em seguida foi realizada a montagem *de novo* dos genomas sequenciados, utilizando o algoritmo SPAdes v3.1.0. As *contigs* geradas foram ordenadas com o genoma de referência *M. tuberculosis* H37Rv no programa CONTIGuator e anotadas com o algoritmo BASys. Para o encontro das variantes, os genomas foram comparados com o genoma de referência *M. tuberculosis* H37Rv, utilizando o *pipeline* SNiPer (Genoscope), que é baseado no pacote SSAHA2. As variantes encontradas sofreram filtros quanto a presença em regiões repetitivas, cobertura, qualidade e heterozigotidade. A caracterização de mutações sinônimas e não sinônimas foi feita com o método Nei-Gojobori baseado no SNAP. O alinhamento de proteínas ortólogas foi feita com o MUSCLE. Os genes que obtiverem mais mutações não-sinônimas nas cepas com resistência do que em cepas não resistentes foram considerados genes candidatos a resistência a drogas.

Para análise de mutações associadas à resistência a diversas drogas foi utilizada a base de dados já validada *TB profiler online tool*. Trata-se de plataforma desenvolvida pela compilação de 1.325 marcadores de resistência a drogas (SNPs e indels) em 992 diferentes posições em nucleotídeos de 31 loci, 6 promotores e 25 regiões codificantes. Foram compiladas informações sobre resistência a rifampicina, isoniazida, pirazinamida, etambutol, etionamida, estreptomicina, amicacina,

capreomicina, canamicina, moxifloxacina, ofloxacina, ácido para-aminosalicílico, linezolida, clofazimina e bedaquilina. Também foram compilados dados sobre polimorfismos associados a TB-MDR e TB-XDR. Foram excluídas SNPs filogenéticos em loci associado a resistência a drogas. A validação foi realizada pela análise de dados fenotípicos e de sequenciamento de 792 isolados provenientes de seis países. Posteriormente foi implementada a plataforma *on line* que analise rapidamente sequências brutas e prediz resistência aos fármacos anti-TB (COLL et al., 2015).

4.4.7 Revisão de prontuários médicos

A revisão de prontuários médicos foi possível para os pacientes do Brasil. Dado a escassez de registros médicos confiáveis, estas informações não foram obtidas dos pacientes provenientes de Moçambique. Foram coletados dados sobre forma clínica da doença, esquemas terapêuticos utilizados, resposta terapêutica e desfecho (cura, abandono ou óbito).

4.5 Banco de dados

O perfil de mutações obtidas pelas diferentes metodologias, o resultado do teste fenotípico realizado e informações coletadas de prontuários médicos formaram um banco de dados na planilha EXCEL para posterior análise.

4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos através dos testes de sensibilidade e do sequenciamento genômico total foram apresentados de forma descritiva e comparados a dados disponíveis na literatura.

4.7 Aspectos éticos

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética e Pesquisa do HCRP e FMRP-USP e aprovado de acordo com o processo HCRP número 17471/2014 em 03 de fevereiro de 2015 (Anexo A). Como envolve isolados de *M. tuberculosis* de

Moçambique, o projeto foi também submetido e aprovado pelo Comitê Nacional de Bioética para Saúde de Moçambique (Parecer: Ref: 359/CNBS/14) em 03 de novembro de 2014 (Anexo B).

5 Resultados

5.1 Características demográficas dos pacientes incluídos no estudo

Foram incluídos no estudo 17 pacientes provenientes da região nordeste do estado de São Paulo (seguidos no HC FMRP-USP). Destes pacientes, 15 (88,2%) eram do sexo masculino e dois (11,7%) eram coinfectados com HIV. Doença pulmonar foi diagnosticada em 16 pacientes (94,1%) e um (5,9%) apresentou a forma pleural da doença. Quanto ao desfecho clínico, 13 (76,4%) pacientes apresentaram boa evolução clínica seguida de cura, dois (11,8%) evoluíram para óbito, um (5,9%) abandonou o tratamento e um (5,9%) está em tratamento alternativo atual com evidência de falência terapêutica. Quinze pacientes tiveram o esquema terapêutico alterado baseado em um ou mais testes de sensibilidade com evidência de resistência. Dois tratamentos não sofreram alteração, sendo um por óbito precoce e outro pela realização posterior ao tratamento dos testes de sensibilidade, porém este paciente respondeu adequadamente ao esquema de primeira linha.

A seguir, apresenta-se breve resumo destes casos:

Isolado 241: Paciente realizou tratamento de TB latente com isoniazida devido a teste tuberculínico reagente e necessidade de utilização de medicamento imunobiológico para tratamento de artrite reumatoide. Após um ano do término do tratamento de TB latente, apresentou diagnóstico de TB pulmonar. Iniciado esquema de primeira linha, sendo o esquema ajustado quatro meses depois devido à evidência de resistência à isoniazida, porém as culturas foram persistentemente negativas. Apresentou boa evolução e teve alta por cura.

Isolado 536: Paciente presidiário com antecedente de três episódios de TB pulmonar, tratados com esquema de primeira linha. Ao término do terceiro tratamento, foi realizado teste de sensibilidade molecular e fenotípico, sendo alterado esquema para tratamento de multidroga-resistência. Apresentou boa evolução e teve alta por cura.

Isolado 868: Paciente portador de HIV com antecedente de dois tratamentos para TB pulmonar tratados com esquema de primeira linha. Em novo diagnóstico de TB pulmonar, reiniciado esquema de primeira linha, alterado após um mês devido à presença de resistência a rifampicina. Apresentou boa evolução clínica e teve alta por cura.

Isolado 1028: Paciente presidiário, com história de um tratamento completo e outro irregular para TB pulmonar. Ao final deste tratamento irregular, devido à persistência de baciloscopia positiva, foi reiniciado esquema de primeira linha, alterado após um mês pela detecção de resistência à isoniazida. Houve boa evolução clínica e alta por cura.

Isolado 1245: Paciente com diagnóstico de TB pulmonar em tratamento com esquema de primeira linha. Devido à positividade de baciloscopia no quarto mês de tratamento, solicitado teste de sensibilidade, com evidência de quadro de MDR. Após resultado, alterado tratamento. Paciente apresentou boa evolução clínica, tendo recebido alta por cura.

Isolado 1662: Paciente ex-presidiário e portador de HIV, com antecedente de um tratamento completo para TB pulmonar. Em segundo episódio da doença, foi evidenciada resistência e alterado esquema terapêutico para multidroga resistência (momento da coleta do isolado avaliado pelo sequenciamento genômico). No 11º mês do tratamento de TB-MDR, por persistência de culturas positivas, realizado novo teste de sensibilidade, com resistência às fluoroquinolonas. Transicionado ofloxacino para moxifloxacino. Paciente ainda em tratamento, com culturas persistentemente positivas.

Isolado 1696: Paciente apresentou diagnóstico de TB pulmonar, sem história de tratamentos anteriores. Teste de sensibilidade rápido evidenciou resistência à rifampicina, sendo iniciado esquema alternativo. Apresentou boa evolução clínica, com alta por cura.

Isolado 1804: Paciente admitido em unidade de emergência em insuficiência respiratória. Devido a suspeita clínica e epidemiológica de TB pulmonar, solicitado investigação, a qual confirmou o diagnóstico e evidenciou resistência a rifampicina por teste rápido molecular. Paciente evoluiu para óbito após sete dias de tratamento.

Isolado 1874: Paciente durante tratamento de primeiro episódio de TB pulmonar apresentou persistência de culturas positivas, sendo solicitado teste de sensibilidade fenotípico, que evidenciou resistência à estreptomicina e isoniazida. O tratamento foi alterado e paciente apresentou boa resposta clínica e alta por cura.

Isolado 2080: Paciente admitido por quadro de trauma. No entanto, exame de imagem pulmonar era sugestivo de TB, sendo então indicada investigação, que

comprovou o diagnóstico. Na ocasião o tratamento foi realizado sem a realização de testes de sensibilidade. Assim, foi concluído o tratamento com esquema de primeira linha, com boa resposta clínica e alta por cura.

Isolado 2370: Paciente proveniente da Angola. Devido ao diagnóstico de TB-MDR pulmonar, ficou em tratamento sob regime de internação hospitalar por cinco anos no Brasil. No entanto, houve progressão de resistência a drogas, sendo diagnosticado TB-XDR. Evoluiu para óbito.

Isolado 2591: Paciente durante primeiro episódio de TB pulmonar evoluiu para falência ao esquema de primeira linha, sendo evidenciado multidroga resistência. Instituído tratamento específico. Evoluiu com boa evolução e alta por cura.

Isolado 2782: Paciente com histórico de episódio de TB pulmonar tratada com alta cura. Houve recidiva após um ano do término do tratamento. Como houve persistência de cultura positiva no quinto mês do segundo tratamento, foi solicitado teste de sensibilidade, com alteração de tratamento. Apresentou boa evolução clínica e alta por cura.

Isolado 2943: Paciente em tratamento de primeiro episódio de TB pulmonar com esquema de primeira linha. Como apresentou persistência de cultura positiva no quarto mês de tratamento, foi solicitado teste de sensibilidade. Devido à detecção de resistência a rifampicina, o tratamento foi alterado e paciente apresentou boa evolução clínica, tendo recebido alta por cura.

Isolado 3052: Paciente em tratamento de primeiro episódio de TB pulmonar com esquema de primeira linha. Houve persistência de cultura positiva no quinto mês de tratamento, sendo realizado teste de sensibilidade e alterado esquema terapêutico. Houve boa resposta terapêutica e alta por cura.

Isolado 3200: Paciente em tratamento para linfoma de Hodgkin evoluiu com derrame pleural. Em investigação, comprovou-se diagnóstico de TB pleural. Teste de sensibilidade evidenciou multidroga-resistência, sendo alterado esquema terapêutico. Paciente abandonou o tratamento.

Isolado 3360: Paciente em tratamento para TB pulmonar apresentou persistência de cultura positiva no quarto mês de tratamento. Teste de sensibilidade evidenciou multidroga-resistência, sendo alterado esquema terapêutico. Houve boa evolução clínica e alta por cura.

Também foram incluídos no estudo 13 pacientes provenientes da província de Sofala, na região central de Moçambique, seguidos no hospital Central da Beira. Destes pacientes, sete (53,8%) eram homens e seis (46,1%) eram coinfectados com HIV. Todos os casos foram diagnosticados com doença pulmonar. Considerando-se a escassez de registros médicos, não foi possível obter dados sobre tratamentos realizados e desfecho clínico dos casos.

5.2 Descrição do perfil de sensibilidade e de mutações associadas à resistência a drogas dos isolados estudados

Os 30 isolados incluídos neste estudo foram submetidos a quatro testes de sensibilidade comerciais distintos: Genotype MTBDRplus, Genotype MTBDRsl (Hain Lifescience, GmbH, Germany), Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) e teste fenotípico BACTEC MGIT 960 SIRE (MGIT 960; Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD).

Todos também foram submetidos ao sequenciamento genômico total, cujos resultados foram analisados pela plataforma *TB profiler online tool*, que permite a detecção de mutações já descritas como associadas à resistência a drogas tuberculostáticas (COLL et al., 2015). Os resultados da análise da qualidade do sequenciamento demonstraram um alto valor de Phread score (>30), tanto quando verificou-se dados brutos como na análise dos dados trimados. Para todos os isolados, mais de 99% do genoma de referência foi coberto por pelo menos uma *read*, com profundidade de cobertura com valor mínimo de 20, máximo de 80 e média de 44.

Na tabela 1 apresentamos os resultados dos testes realizados para cada isolado de Moçambique e na tabela 2 estão expostos os resultados referentes aos isolados do Brasil.

Tabela 1 - Perfil de resistência e de mutações evidenciadas pelos testes de sensibilidade e pelo sequenciamento genômico total dos isolados de Moçambique

N	MZB Isolado ID	MTBDR plus		MTBDR sl		Xpert R	Teste fenotípico				Sequenciamento genômico total							
		Mut R	Mut H	Mut Fq	Mut ISLD		R	H	E	S	Mut R	Mut H	Mut Z	Mut E	Mut S	Mut ISLD	Mut Fq	Mut PAS
1	227	S531L	WT, S315T2 (Kat G)			Sim	Sim	Sim	Não	Não	rpoB Ser450Leu	KatG Ser315Thr						
2	243	WT8, WT6	WT2 (inhA)			Não	Não	Não	Não	Não	embC Thr270Ile, embB Glu378Ala							
3	751		WT, S315T2 (Kat G)			Não	Sim	Sim	Sim	Sim	rpoB Val170Phe	KatG Ser315Thr	pncA Lys96Arg	embB Met306Val	rpsL Lys43Arg			
4	894		WT, S315T2 (kat G)			Não	Não	Sim	Não	Sim	KatG Ser315Thr		rpsL Lys43Arg					
5	964	WT7, H526D				Sim	Sim	Não	Não	Não	rpoB His445Tyr							
6	2075					Não	Não	Sim	Não	Sim	KatG Ser315Thr		rpsL Lys43Arg					
7	2078		WT, S315T2 (kat G)			Não	Sim	Sim	Sim	Sim	rpoB Val170Phe	KatG Ser315Thr	pncA Lys96Arg	embB Met306Val	rpsL Lys43Arg			
8	2368	WT8, S531L	WT, S315T2 (kat G), WT1, T8C (inhA)	WT2, A90V (gyr A)	WT2, C14T (eis)	Sim	Inv	Inv	Inv	Inv	rpoB Ser450Leu	KatG Ser315Thr	pncA Arg154Gly	embB Met306Ile	gyrA Ala90Val			
9	2721	WT7	WT, S315T2 (kat G)	WT2, A90V (gyr A)		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	rpoB His445Tyr	KatG Ser315Thr	pncA Leu19Arg	embB Gln497Arg	rpsL Lys43Arg		gyrA Ala90Val	
10	2937					Não	Não	Sim	Não	Não	kasA Gly269Ser		embB Met306Ile rpsL Lys88Arg					
11	3033	S531L	WT, S315T2 (kat G)			Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	rpoB Ser450Leu	KatG Ser315Thr		embB Gln497Arg	rpsL Lys43Arg			
12	3150					Não	Não	Não	Não	Sim	embC Thr270Ile, embB Glu378Ala							
13	3185	WT7	WT, S315T2 (kat G)	WT2, A90V (gyr A)		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	rpoB His445Tyr	KatG Ser315Thr	pncA Leu19Arg	embB Gln497Arg	rpsL Lys43Arg		gyrA Ala90Val	

Mut R: mutações no gene rpoB associadas a resistência a rifampicina.

Mut H: mutações associadas a resistência a isoniazida.

Mut Fq: mutações associadas a resistências às fluoroquinolonas

Mut iSLD: mutações associadas a resistência a aminoglicosídeos injetáveis de segunda linha

WT: ausência de banda selvagem

Xpert R: resistência a rifampicina evidenciada pelo Xpert MTB/RIF

R: rifampicina

H: isoniazida

E: etambutol

S: estreptomicina

Z: pirazinamida

PAS: ácido para-aminosalicílico

Inv: inválido

Tabela 2 - Perfil de resistência e de mutações evidenciadas pelos testes de sensibilidade e pelo sequenciamento genômico total dos isolados do Brasil

N	BRA	MTBDR plus		MTBDR sl		Xpert	Teste fenotípico					Sequenciamento genômico total							
	Isolado ID	Mut R	Mut H	Mut Fq	Mut iSLD	R	R	H	E	S	Mut R	Mut H	Mut Z	Mut E	Mut S	Mut iSLD	Mut Fq	Mut PAS	
1	241		WT, S315T1 (kat G)			Não	Não	Sim	Não	Não		KatG Ser315Thr, KasA Gly269Ser							
2	536	WT8, S531L				Não	Sim	Sim	Não	Não									
3	868	WT8, S531L		WT2, A90V (gyr A)		Sim	Sim	Não	Não	Não	rpoB Ser450Leu						gyrA Ala90Val		
4	1028		WT, S315T1 (kat G)			Não	Não	Sim	Não	Não		KatG Ser315Thr							
5	1245	WT7	WT, S315T1 (kat G), WT (inh A)			Sim	Sim	Sim	Não	Não	rpoB His445Leu	KatG Ser315Thr							
6	1662	WT8, S531L	WT, S315T1 (kat G)			Sim	Sim	Sim	Não	Sim	rpoB Ser450Leu	KatG Ser315Thr	pncA Ala3Pro	embB Met306Val	rpsL Lys43Arg				
7	1696	WT3				Sim	Não	Não	Não	Não									
8	1804		WT, S315T1 (kat G)			Não	Não	Sim	Não	Não		KatG Ser315Thr, KasA Gly269Ser							
9	1874		WT1, C15T (inh A)			Não	Não	Sim	Não	Sim		inhA C15T							
10	2080		WT, S315T1 (kat G)			Não	Não	Sim	Não	Sim		KatG Ser315Thr				rrs intragenic			
11	2370	WT8, S531L	WT, S315T1 (kat G)	WT3, D94N/Y (gyr A)	WT1 A1401G (rrs)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	rpoB Ser450Leu	KatG Ser315Thr	pncA Ser104Arg	embB Met306Ile	rpsL Lys88Arg, rrs intragenic	rrs intragenic	gyrA Asp94Asn	folC Arg49Gln	
12	2591	WT8, S531L	WT, S315T1 (kat G)			Sim	Sim	Sim	Não	Não	rpoB Ser450Leu	KatG Ser315Thr, KasA Gly269Ser	pncA Arg140His, pncA Phe94Val						
13	2782	WT2	WT, C15T (inh A)			Sim	Não	Sim	Não	Não									
14	2943	WT3				Sim	Não	Não	Não	Sim	rpoB Ser431Thr				rrs intragenic	rrs intragenic			
15	3052	S531L	WT, S315T1 (kat G)			Sim	Sim	Sim	Não	Não	rpoB Ser450Leu	KatG Ser315Thr							
16	3200	WT8, S531L	WT, S315T1 (kat G)	WT3, A90V, D94G, D94N/Y (gyr A)		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	rpoB Ser450Leu	KatG Ser315Thr	pncA Ala3Pro	embB Met306Val	rpsL Lys43Arg		gyrA Ala90Val, gyrA Asp94Gly		
17	3360	S531L	WT, S315T1 (kat G)			Não	Sim	Sim	Não	Não		KatG Ser315Thr, KasA Gly269Ser		embB Met306Ile					

Mut R: mutações no gene rpoB associadas a resistência a rifampicina.

Mut H: mutações associadas a resistência a isoniazida.

Mut Fq: mutações associadas a resistências às fluoroquinolonas

Mut iSLD: mutações associadas a resistência a aminoglicosídeos injetáveis de segunda linha

WT: ausência de banda selvagem

Xpert R: resistência a rifampicina evidenciada pelo Xpert MTB/RIF

R: rifampicina

H: isoniazida

E: etambutol

S: estreptomicina

Z: pirazinamida

PAS: ácido para-aminossalicílico

Em relação às mutações associadas à resistência a rifampicina, cabe ressaltar que a mutação S531L detectada pelo teste Genotype MTBDRplus corresponde à mutação S450L evidenciada pelo sequenciamento genômico. A primeira está relacionada com o gene *rpoB* de *Escherichia coli* e a segunda foi descrita no genoma da cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv (KUMAR; JENA, 2014).

5.3 Análise das mutações associadas à resistência bacilar detectadas pelo sequenciamento genômico total para cada droga estudada

A análise do sequenciamento genômico total foi realizada através da base de dados *TB profiler online tool* (COLL et al., 2015), com o objetivo de descrever quais das mutações detectadas pelo sequenciamento já foram descritas como associadas a resistência a drogas por esta plataforma.

Com relação à resistência à rifampicina, a mutação mais frequentemente encontrada nas cepas do Brasil foi a Ser450Leu no gene *rpoB*, enquanto que nos isolados de Moçambique prevaleceram a Ser450Leu e a His445Tyr, também no gene *rpoB*. Dos 12 isolados do Brasil resistentes a esta droga, sete (58,3%) apresentaram resistência pelos quatro ensaios: Genotype MTBDRplus, Xpert MTB/RIF, teste fenotípico BACTEC MGIT 960 SIRE e sequenciamento genômico total (Figura 5). Dos oito isolados com resultados válidos de Moçambique, cinco (62,5%) apresentaram resistência pelos quatro ensaios realizados (Figura 6). Considerando-se o teste fenotípico como padrão ouro, optamos por calcular a sensibilidade e especificidade do sequenciamento genômico total para detecção de resistência dos isolados incluídos no estudo. Para detecção de resistência à rifampicina, a sensibilidade nesta amostra de 30 isolados foi de 87,5% e a especificidade foi de 92,3%. A concordância do sequenciamento genômico com o teste fenotípico para a detecção de resistência a esta droga foi de 89,6%.

Ainda em relação à detecção de resistência à rifampicina, realizou-se também a avaliação de sensibilidade, especificidade e concordância dos testes moleculares Genotype MTBDRplus e Xpert MTB/RIF, também utilizando-se o teste fenotípico como padrão ouro. O primeiro apresentou sensibilidade de 82,3%, especificidade de 66,7% e concordância de 75,8%. Já o segundo apresentou sensibilidade de 75%, especificidade de 76,9% e concordância de 75,8%.

Figura 5 - Descrição das mutações associadas à resistência à rifampicina detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados dos testes de sensibilidade dos isolados do Brasil a esta droga.

<i>rpoB</i>	Isolados - Brasil																																			
Mutações rifampicina	536			868			1245			1662			1696			2370			2591			2782			2943			3052			3200			3360		
	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X			
Ser431Thr																																				
His445Leu																																				
Ser450Leu																																				

	Resistência detectada por teste fenotípico
	Resistência detectada pelo Genotype MTBDRplus
	Resistência detectada pelo Xpert RIFTB
	Mutação detectada pelo sequenciamento genômico
	Nenhuma resistência detectada

Figura 6 - Descrição das mutações associadas à resistência à rifampicina detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados dos testes de sensibilidade dos isolados de Moçambique a esta droga.

<i>rpoB</i>	Isolados - Moçambique																										
Mutações rifampicina	227			243			751			964			2078			2368			2721			3033			3185		
	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X			
Val170Phe															*												
His445Tyr																											
Ser450Leu																											

	Resistência detectada por teste fenotípico
	Resistência detectada pelo Genotype MTBDRplus
	Resistência detectada pelo Xpert RIFTB
	Mutação detectada pelo sequenciamento genômico
	Nenhuma resistência detectada
*	Teste fenotípico inválido

Na avaliação de resistência à isoniazida, a mutação Ser315Thr no gene *katG* foi a mais frequente tanto nas cepas do Brasil quanto nas de Moçambique. Dos 14 isolados do Brasil resistentes a esta droga, 12 (85,7%) apresentaram resistência pelos três ensaios: Genotype MTBDRplus, teste fenotípico BACTEC MGIT 960 SIRE e sequenciamento genômico total (Figura 7). Dos 10 isolados de Moçambique, sete (70%) apresentaram resistência pelos três ensaios realizados (Figura 8). A sensibilidade do sequenciamento genômico para detecção de resistência a esta droga no total de isolados avaliados foi de 95,6% e a especificidade foi de 100%. A concordância do sequenciamento genômico com o teste fenotípico foi de 96,5%.

Assim como realizado para rifampicina, analisou-se também a sensibilidade, especificidade e concordância do teste molecular Genotype MTBDRplus utilizando-se o teste fenotípico como padrão ouro. A sensibilidade foi de 88%, a especificidade de 75% e a concordância de 86,2%.

Figura 7 - Descrição das mutações associadas à resistência à isoniazida detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados dos testes de sensibilidade dos isolados do Brasil a esta droga.

katG/ kasA	Isolados - Brasil																											
Mutações isoniazida	241		536		1028		1245		1662		1804		1874		2080		2370		2591		2782		3052		3200		3360	
	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G
katG Ser315Thr																												
kasA Gly269Ser																												
inhA C15T																												

Resistência detectada por teste fenotípico

Resistência detectada pelo Genotype MTBDRplus

Mutação detectada pelo sequenciamento genômico

Nenhuma resistência detectada

Figura 8 - Descrição das mutações associadas à resistência à isoniazida detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados dos testes de sensibilidade dos isolados de Moçambique a esta droga.

katG/ kasA	Isolados - Moçambique																							
Mutações isoniazida	227		243		751		894		2075		2078		2368		2721		2937		3033		3185			
	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G		
katG Ser315Thr																								
kasA Gly269Ser													*											

	Resistência detectada por teste fenotípico
	Resistência detectada pelo Genotype MTBDRplus
	Mutação detectada pelo sequenciamento genômico
	Nenhuma resistência detectada
*	Teste fenotípico inválido

A mutação mais frequente associada à resistência à estreptomicina encontrada nas cepas do Brasil foi uma mutação intragênica no gene *rrs*, enquanto que nos isolados de Moçambique prevaleceu a mutação Lys43Arg no gene *rpsL*. Dos seis isolados do Brasil resistentes a esta droga, cinco (83,3%) apresentaram resistência pelos dois ensaios: teste fenotípico BACTEC MGIT 960 SIRE e sequenciamento genômico total (Figura 9). Dos nove isolados de Moçambique, sete

(77,7%) apresentaram resistência pelos dois ensaios realizados (Figura 10). A sensibilidade do sequenciamento genômico para detecção de resistência a esta droga no total de isolados incluídos foi de 85,7% e a especificidade foi de 93,3%. A concordância do sequenciamento genômico com o teste fenotípico foi de 89,6%.

Figura 9 - Descrição das mutações associadas à resistência à estreptomicina detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados do Brasil a esta droga.

rpsL/rrs	Isolados - Brasil					
Mutações estreptomicina	1662	1874	2080	2370	2943	3200
	P	P	P	P	P	P
rpsL Lys43Arg						
rpsL Lys88Arg						
rrs intragenic						

	Resistência detectada por teste fenotípico
	Mutação detectada pelo sequenciamento genômico

Figura 10 - Descrição das mutações associadas à resistência à estreptomicina detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados de Moçambique a esta droga.

rpsL/rrs	Isolados - Moçambique								
Mutações estreptomicina	751	894	2075	2078	2721	2937	3033	3150	3185
	P	P	P	P	P	P	P	P	P
rpsL Lys43Arg									
rpsL Lys88Arg									

	Resistência detectada por teste fenotípico
	Mutação detectada pelo sequenciamento genômico
	Nenhuma resistência detectada

Em relação às fluoroquinolonas, a mutação mais frequente tanto nas cepas do Brasil quanto nas de Moçambique foi a Ala90Val no gene *gyrA*. Todos os três isolados do Brasil quanto os três de Moçambique resistentes a esta droga apresentaram resistência pelos dois ensaios realizados: Genotype MTBDRsl e sequenciamento genômico total (Figura 11 e 12).

Figura 11 - Descrição das mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados do Brasil a esta droga.

gyrA	Isolados - Brasil		
Mutações fluoroquinolonas	868	2370	3200
	G	G	G
Ala90Val			
Asp94Asn			
Asp94Gly			

	Resistência detectada pelo Genotype MTBDRplus
	Mutação detectada pelo sequenciamento genômico

Figura 12 - Descrição das mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados de Moçambique a esta droga.

gyrA	Isolados - Moçambique		
Mutações fluoroquinolonas	2368	2721	3185
	G	G	G
Ala90Val			

	Resistência detectada pelo Genotype MTBDRplus
	Mutação detectada pelo sequenciamento genômico

Com relação à resistência ao etambutol, as mutações mais frequentes nas cepas do Brasil foram Met306Val e Met306Ile no gene *embB*, enquanto que nos isolados de Moçambique foi a mutação Gln497Arg também no gene *embB*. Dos quatro isolados do Brasil resistentes a esta droga, dois (50%) apresentaram resistência pelos dois ensaios: teste fenotípico BACTEC MGIT 960 SIRE e sequenciamento genômico total (Figura 13). Dos oito isolados de Moçambique, cinco (62,5%) apresentaram resistência pelos dois ensaios realizados (Figura 14). A sensibilidade do sequenciamento genômico para detecção de resistência a esta droga no total de isolados incluídos foi de 100% e a especificidade foi de 77,2%. A concordância de sequenciamento genômico com o teste fenotípico foi de 82,7%.

Figura 13 - Descrição das mutações associadas à resistência ao etambutol detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados do Brasil a esta droga.

embB	Isolados - Brasil			
Mutações etambutol	1662	2370	3200	3360
	P	P	P	P
Met306Val				
Met306Ile				

	Resistência detectada por teste fenotípico
	Mutação detectada pelo sequenciamento genômico
	Nenhuma resistência detectada

Figura 14 - Descrição das mutações associadas à resistência ao etambutol detectadas pelo sequenciamento genômico e resultados do teste de sensibilidade dos isolados de Moçambique a esta droga.

embB/embC	Isolados - Moçambique								
Mutações etambutol	243	751	2078	2368	2721	2937	3033	3150	3185
	P	P	P	P	P	P	P	P	P
embB Met306Val				*					
embB Met306Ile									
embB Gln497Arg									
embB Glu378Ala									
embC Thr270Ile									

	Resistência detectada por teste fenotípico
	Mutação detectada pelo sequenciamento genômico
	Nenhuma resistência detectada

Resistência aos aminoglicosídeos injetáveis de segunda linha foi detectada em dois isolados do Brasil. Em um deles foi detectada a mutação A1401G no gene *rrs* pelo Genotype MTBDRsl e mutação intragênica no mesmo gene pelo sequenciamento genômico. Para o outro houve apenas detecção de mutação intragênica no gene *rrs* pelo sequenciamento genômico. Quanto aos isolados de Moçambique, foi evidenciada resistência em apenas um. Houve detecção da mutação C14T no gene *eis* pelo Genotype MTBDRsl, sem correspondência com o sequenciamento genômico.

Resistência a pirazinamida foi avaliada apenas pelo sequenciamento genômico. A mutação mais frequente nos isolados do Brasil foi a Ala3Pro no gene *pncA*. Entre os isolados de Moçambique, as mutações Lys96Arg e Leu19Arg no gene *pncA* foram as mais frequentes.

6 *Discussão*

6.1 Avaliação de mutações associadas à resistência aos fármacos anti-TB e sua correspondência fenotípica

Uma das mais importantes aplicações clínicas do sequenciamento genômico é a determinação de genótipos que podem prever resistência fenotípica a drogas. Entretanto, esta correlação entre genótipo e fenótipo é ainda uma questão não resolvida, que exige avanços no conhecimento da correta identificação de SNPs realmente associados à resistência micobacteriana. Diversos estudos atuais vem utilizando o sequenciamento genômico para avaliar esta correlação, descrevendo dados sobre sensibilidade e especificidade desta técnica. Neste contexto, especificidade diz respeito à probabilidade de que SNPs identificados causem resistência fenotípica e sensibilidade descreve a proporção de casos resistentes que são identificados através da detecção de determinados SNPs. No entanto, a acurácia da predição de resistência apresenta variação não somente entre classes de drogas, como também a diferentes membros da mesma classe. Também deve ser ponderado que o padrão ouro utilizado para comparações são testes fenotípicos em meio de cultura, que também tem sua própria taxa de erro. Além disso, é fundamental a compreensão de que o fenômeno da resistência não é binário, havendo impacto variável de diferentes mutações no MIC das cepas (HILLEMANN et al., 2013; WITNEY et al., 2016).

Na presente casuística, foram obtidos dados de sensibilidade e especificidade do sequenciamento genômico para as quatro drogas cuja avaliação por teste fenotípico, considerado como padrão ouro, foi realizada: rifampicina, isoniazida, etambutol e estreptomicina. Para detecção de resistência a rifampicina, a sensibilidade do sequenciamento genômico nesta amostra foi de 87,5% e a especificidade foi de 92,3%. A sensibilidade para detecção de resistência a isoniazida foi de 95,6% e a especificidade foi de 100%. A sensibilidade para detecção de resistência ao etambutol foi de 100% e a especificidade foi de 77,2%. A sensibilidade para detecção de resistência à estreptomicina foi de 85,7% e a especificidade foi de 93,3%.

Coll et al. (2015) avaliaram isolados provenientes de diferentes países para obtenção de dados sobre sensibilidade e especificidade do sequenciamento genômico em prever resistência a drogas, também utilizando teste fenotípico como referência. Em relação à rifampicina, estes autores encontraram sensibilidade de

96,2% e especificidade de 98,1%. Para a isoniazida, os valores de sensibilidade e especificidade foram respectivamente 92,8% e 100%. Para etambutol, os valores foram mais baixos, sendo 88,7% de sensibilidade e 81,7% de especificidade. Já para estreptomicina, obtiveram 87,1% de sensibilidade e 89,7% de especificidade.

Walker et al. (2015) avaliaram os mesmos dados, também utilizando isolados provenientes de diferentes países. Sobre resistência à rifampicina, obtiveram dados de sensibilidade e especificidade respectivamente de 91,7% e 99,2%. Em relação à isoniazida, a sensibilidade foi de 85,2% e a especificidade foi de 98,4%. Para etambutol, os valores de sensibilidade e especificidade foram respectivamente de 82,3% e 95,1%. Já para estreptomicina, relataram 81,6% de sensibilidade e 99,1% de especificidade.

Chatterjee et al. (2017) avaliaram isolados provenientes da Índia tanto por teste fenotípico quanto pelo sequenciamento genômico total. A sensibilidade para predição de resistência à rifampicina e à isoniazida foi de 100%, enquanto que a especificidade foi de 94%. Para etambutol a sensibilidade também foi de 100% e a especificidade 78%. Para estreptomicina, a sensibilidade foi de 85% e a especificidade 100%.

Em revisão sistemática para avaliação da acurácia do sequenciamento genômico em prever resistência a drogas, Papaventsis et al. (2017) avaliaram 20 estudos. Em relação à resistência a rifampicina, os valores de sensibilidade variaram de 89,2 a 100% e os de especificidade variaram de 66,7 a 100%. Dados agrupados resultaram em 98% de sensibilidade e de especificidade. Sobre resistência a isoniazida, houve variação de 90 a 100% nos valores de sensibilidade e 83,3 a 100% nos valores de especificidade. Dados agrupados revelaram 97% de sensibilidade e 93% de especificidade na predição de resistência a esta droga. Devido à heterogeneidade entre os estudos, a variação de dados na análise de resistência à estreptomicina e ao etambutol foi muito grande, o que impediu interpretações acuradas. Sensibilidade e especificidade de predição de resistência ao etambutol variaram de 71,4 a 100% e 15,4 a 95,8%, respectivamente. Em relação à estreptomicina, a variação foi de 57,1 a 100% nos valores de sensibilidade e 40 a 100% nos valores de especificidade.

É importante ressaltar que utilizamos para interpretação dos dados do sequenciamento a plataforma já validada *TB profiler online tool*. Phelan et al. (2016) avaliaram a concordância dos dados obtidos com esta plataforma com aqueles

obtidos por teste fenotípico. A taxa global de concordância foi de 95,3%, sendo obtida concordância total para a maioria das drogas testadas, exceto para pirazinamida e ácido para-aminosalicílico.

6.2 Mutações associadas à resistência à rifampicina

Neste estudo, a mutação mais frequentemente detectada pelo sequenciamento genômico nas cepas do Brasil foi a Ser450Leu (Ser531Leu em *Escherichia coli*) no gene *rpoB*, enquanto que nos isolados de Moçambique prevaleceram a Ser450Leu e a His445Tyr (His526Tyr em *Escherichia coli*), também no gene *rpoB*.

A maioria dos casos de resistência à rifampicina deve-se à presença de mutações em região bem definida de 81 pares de bases do gene *rpoB*, denominada RRDR. Diversos trabalhos demonstram que a mutação Ser450Leu é a mais frequentemente associada à resistência a rifampicina. (RAMASWAMY; MUSSER, 1998; BROSSIER et al., 2017). Uma justificativa para a elevada frequência desta mutação é que isolados clínicos portando esta alteração frequentemente apresentam mutações adicionais no mesmo gene, que possivelmente são mutações compensatórias da perda de fitness induzida pela mutação inicial (GAGNEUX et al., 2006).

Esta mutação é detectada pelo teste Genotype MTBDRplus. Assim, Hillemann, Rusch-Gerdes e Richter (2007) também encontraram este dado em seu estudo, no qual a mutação S513L no gene *rpoB* ocorreu em 73,6% das amostras avaliadas pelo teste Genotype MTBDRplus. Vijdea et al. (2008) encontraram percentual de 86% em estudo semelhante.

Campbell et al. (2011) evidenciaram em sua casuística que a maioria dos isolados fenotipicamente resistentes à rifampicina apresentavam as mutações Ser531Leu e His526Tyr, em repectivamente 62,1% e 11,5% do total de isolados avaliados.

Witney et al. (2015) encontraram em sua série de casos as mutações Ser450Leu e Leu430Pro como associadas à resistência fenotípica.

É sabido que diferentes mutações nesta região podem conferir diferentes fenótipos de resistência, com grandes variações nos valores de MIC e diferentes perfis de resistência a drogas desta classe. A mutação Ser450Leu e a His445Tyr

conferem alto nível de resistência a todas as rifamicinas, o que impede o uso desta classe de drogas para terapêutica (JAMIESON et al., 2014; OHNO et al., 1996).

Houve discrepâncias entre o resultado do teste fenotípico e do sequenciamento genômico para resistência a esta droga no presente estudo. Em dois isolados, o teste fenotípico evidenciou resistência sem a correspondente detecção de mutações pelo sequenciamento. Em um isolado, foi observado o oposto. Este fato pode estar relacionado à presença de mais de uma cepa de *M. tuberculosis* no mesmo espécime clínico.

Apesar da maioria das mutações associadas à resistência a esta droga estar localizada na RRDR, dois isolados de Moçambique (751 e 2078) apresentaram a mutação Val170Phe também no gene *rpoB*, porém fora da referida região. Assim sendo, não é possível detectá-la pelos testes moleculares comerciais disponíveis (ANDRE et al., 2017a). Neste estudo também não foi identificada a mutação Ile491Phe no gene *rpoB*, descrita em até 30% dos isolados de TB-MDR em um estudo que avaliou isolados da África (ANDRE et al., 2017b).

6.3 Mutações associadas à resistência à isoniazida

Neste estudo, a mutação Ser315Thr no gene *katG* foi a mais frequente tanto nas cepas resistentes à isoniazida do Brasil quanto nas de Moçambique.

A base molecular da resistência à isoniazida é mais complexa que a da rifampicina, já que diferentes mutações em diferentes genes estão associadas à resistência. As principais estão presentes nos genes *katG*, *inhA* e *kasA* (ALMEIDA DA SILVA; PALOMINO, 2011). Geralmente as mutações no gene *katG* causam resistência de alto nível, enquanto que aquelas no *inhA* e *kasA* resultam em resistência de baixo nível (JACOBSON et al., 2011; UNISSA et al., 2016). Segundo alguns autores, as mutações no gene *KatG* são mais comumente encontradas nos isolados MDR, enquanto que aquelas no gene *inhA* são mais frequentes nos isolados com monorresistência (BAKONYTE et al., 2003; HAZBÓN et al., 2006).

Mutações no gene *katG* são as alterações mais comuns associadas à resistência a isoniazida, sendo a mais comum a Ser315Thr (ZHANG et al., 1992).

Bollela et al. (2016) evidenciaram mutações no gene *katG* em 54,5% dos isolados provenientes do Brasil incluídos no estudo e em 84,2% dos isolados de

Moçambique. No mesmo estudo, detectou-se que a frequência de mutações no gene *katG* foi maior (68,8% dos casos) entre paciente com uso prévio de isoniazida.

Vijdea et al. (2008) avaliaram dois subgrupos de diferentes localizações geográficas com relação ao perfil de resistência à isoniazida pelo teste Genotype MTBDRplus. Em um dos subgrupos, observou-se a mutação S315T no gene *katG* em todos os isolados resistentes a esta droga e no outro grupo a mutação C15T no gene *inhA* foi a mais frequente (86%) dentre os isolados com resistência de baixo nível à droga. Lacoma et al. (2008) observaram que, em isolados com resistência em alto nível, 80,9% apresentavam a mutação Ser315Thr no gene *KatG* detectada pelo mesmo teste genotípico.

Campbell et al. (2011) avaliaram em seu estudo as mutações associadas à resistência fenotípica à isoniazida. Em 83% dos isolados, a mutação detectada foi a Ser315Thr no gene *katG*, enquanto a mutação C15T no gene *inhA* foi evidenciada em 15,1% dos isolados.

Witney et al. (2015) também evidenciaram a mutação Ser315Thr nos isolados avaliados com resistência fenotípica a esta droga.

Em relação ao impacto clínico destes diferentes perfis de resistência, é necessário atentar-se ao fato de que isolados com resistência de alto nível não respondem ao tratamento com esta droga, no entanto aqueles com resistência de baixo nível geralmente respondem a altas doses de isoniazida (HAZBÓN et al., 2006; WITNEY et al., 2016).

Há divergências na literatura sobre o papel da mutação Gly269Ser no gene *KasA* na resistência à isoniazida, já que não é considerada por alguns autores como associadas a resistência (HAZBÓN et al., 2006). Entretanto, em um dos isolados desta casuística, esta foi a única mutação detectada e, para este isolado, houve concordância com o teste fenotípico.

6.4 Mutações associadas à resistência à pirazinamida

Neste estudo, não foi possível a realização de teste de sensibilidade fenotípico para pirazinamida. Assim, como nenhuma das metodologias comerciais utilizadas contempla a avaliação desta droga, a resistência foi avaliada apenas pelo sequenciamento genômico, não permitindo comparações. A mutação mais frequente nos isolados do Brasil foi a Ala3Pro no gene *pncA*. Entre os isolados de

Moçambique, as mutações Lys96Arg e Leu19Arg no mesmo gene foram as mais frequentes.

O estudo molecular da resistência à pirazinamida é bastante complexo. Sabe-se que diferentes mutações no gene *pncA* são associadas à resistência a esta droga, no entanto estas mutações estão dispersas por diversas regiões e também na região promotora. Assim, há ainda dificuldade na identificação destas mutações e diversas lacunas na compreensão de quais seriam as mais relevantes para a resistência fenotípica, já que postula-se que diferentes mutações impactam de maneira distinta no MIC da droga (MORLOCK et al., 2000; ZHANG et al., 2003; ZHANG; MITCHISON, 2003; WITNEY et al., 2015). Além da dificuldade da compreensão genotípica da resistência a esta droga, testes fenotípicos também são tecnicamente difíceis, dado sua atividade em pH baixo. Ainda questiona-se inclusive sobre concentrações críticas da droga mais adequadas para melhoria da acurácia destes testes (CHANG et al., 2011; WERNGREN et al., 2012).

Zhang et al. (2009) avaliaram mutações gênicas no gene *pncA* em 47 isolados fenotipicamente resistente à pirazinamida. Foram evidenciadas as seguintes mutações com provável associação com a resistência: Leu4Ser, Asp12Ala, Cys14Arg, Gly16Ser, Leu27Pro, Ala36Ala, Lys48Arg, His51Pro, Pro54Leu, Phe58Ser, Pro62Thr, Ser67Pro, Trp68Arg, Thr76Pro, Val130Ala, His137Pro, Val139Ala, Gln141Pro, Thr142Ala, Thr153Ile, Thr167Pro, Val180Phe. Estes autores descreveram que 60,8% das mutações detectadas estavam localizadas em regiões próximas do local de atividade da pirazinamidase ou em locais de ligação de íons metálicos, enquanto que 39,2% estavam dispersas em outras regiões do gene. Neste mesmo trabalho foram evidenciados três isolados com resistência fenotípica à droga que não apresentaram mutações no gene *pncA*, o que pode sugerir, segundo estes autores, o envolvimento de outras regiões genômicas envolvidas na resistência a pirazinamida.

Werngren et al. (2012) compararam mutações detectadas pelo sequenciamento do gene *pncA* e sua correlação com resistência fenotípica, testada com diferentes concentrações da droga. As mutações associadas à resistência de alto nível foram Phe58Leu, Ile6Thr, Val125Phe, Pro54Leu, Phe58Leu, Gly132Ala, Leu172Pro, Val155Gly, Met175Thr, Pro54Ser, Gly132Ser, His51Gln, Arg123Pro e Thr142Lys.

Witney et al. (2015) relataram as mutações Gly132Asp e His57Arg no gene *pncA* como associadas à resistência a pirazinamida em uma pequena série de casos, para a qual realizaram comparação com teste fenotípico.

6.5 Mutações associadas à resistência ao etambutol

Neste trabalho, as mutações mais frequentes nas cepas do Brasil foram Met306Val e Met306Ile no gene *embB*, enquanto que nos isolados de Moçambique foi a mutação Gln497Arg também no gene *embB*.

A maioria das mutações associadas à resistência ao etambutol está localizada no gene *embB*. Diversos trabalhos descreveram que mutações no códon 306 deste gene são as mais frequentes em isolados resistentes. Campbell et al. (2011) evidenciaram as mutações Met306Val e Met306Ile em, respectivamente, 42 e 20,6% dos isolados resistente a este fármaco. No entanto, há divergência no papel de várias mutações localizadas nesta região genômica, sendo ainda controverso o seu real papel na resistência ao etambutol (SAFI et al., 2008). É válido mencionar também que testes fenotípicos para detecção de resistência a esta droga são menos reprodutíveis, dado variações metodológicas, fenômeno de heterorresistência e a probabilidade de faixa estreita entre MICs de cepas selvagens e resistentes (DOMINGUEZ et al., 2016; HORNE et al., 2013; WITNEY et al., 2015).

Mutações no códon 306 do gene *embB* podem conferir resistência de nível baixo ou moderado, entretanto a implicação clínica deste achado ainda não está clara (SIRGEL et al., 2012a). Outros autores relataram que mutações presentes neste códon também são encontradas em isolados sensíveis à droga, o que questiona a confiabilidade destas mutações como marcadores de resistência ao etambutol (MOKROUSOV et al., 2002).

Sirgel et al. (2012a) evidenciaram em sua casuística que a maioria dos isolados com a mutação Met306Ile apresentavam MICs bem próximos da concentração crítica da droga. Para estes isolados houve discordância entre a avaliação genotípica e a fenotípica. Entretanto, a maioria dos isolados com a mutação Met306Val apresentavam valores de MIC bem superiores à concentração crítica determinada e apresentaram concordância com o ensaio fenotípico.

Witney et al. (2015) em pequena série de casos evidenciaram associação das mutações Met306Ile, Met306Val e Gly406Ala com fenótipo de resistência de alto nível ao etambutol.

Considerando-se que cerca de 30 a 70% de isolados resistentes a este fármaco não apresentam mutações no códon 306, torna-se relevante a investigação de outras regiões genômicas. Desta forma, estudos subsequentes descreveram mutações no códon 497 do gene *embB* como também associadas a resistência (SAFI et al., 2010).

De acordo com Ramaswamy et al. (2000) mutações no códon 497 estão associadas a alto nível de resistência ao etambutol. Este achado é discordante de Safi et al. (2010) que evidenciaram associação desta mutação com níveis baixo ou moderados de resistência.

6.6 Mutações associadas à resistência à estreptomicina

Neste estudo, a mutação mais frequente associada à resistência a estreptomicina encontrada nas cepas do Brasil foi uma mutação intragênica no gene *rrs*, enquanto que nos isolados de Moçambique prevaleceu a mutação Lys43Arg no gene *rpsL*.

A maioria das mutações associadas à resistência a estreptomicina ocorrem no gene *rpsL*, que confere resistência de moderado a alto nível a droga. Já mutações no gene *rrs* estão associadas a moderados níveis de resistência (GILLESPIE, 2002; JAGIELSKI et al., 2014; SPRINGER et al., 2001; TUDÓ et al., 2010; WONG et al., 2011).

Mutações nos genes *rpsL* e *rrs* são encontradas em 75 a 90% dos isolados resistentes a esta droga (RAMASWAMY; MUSSER, 1998; DOMINGUEZ et al., 2016).

Sreevatsan et al. (1996) realizaram a avaliação da frequência de mutações nos dois principais genes associados à resistência a droga entre isolados resistentes e sensíveis de diversas localizações geográficas. Em relação aos isolados resistentes, o gene mais frequentemente alterado foi o *rpsL*, sendo as mutações nos códons 43 e 88 as mais frequentes. Em 10% dos isolados avaliados por estes autores, houve detecção de mutações no gene *rrs*, especificamente nos códons 491,

512, 513, 798, 877, 904 e 906. Nenhum dos isolados fenotipicamente sensíveis à estreptomicina apresentou mutações nos dois genes descritos.

Witney et al. (2015) evidenciaram em seu estudo as mutações Lys88Arg e Lys43Arg no gene *rpsL* como associadas a resistência fenotípica à estreptomicina.

Hlaing et al. (2017) avaliaram a associação de diferentes mutações gênicas com a resistência a estreptomicina. As mutações Lys43Arg, Lys88Arg e Lys88Thr no gene *rpsL* foram encontradas exclusivamente nos isolados resistentes a droga, sendo a Lys43Arg a mais frequente, evidenciada em 69,6% dos isolados fenotipicamente resistentes. Nenhuma mutação associada à resistência foi evidenciada no gene *rrs* neste estudo.

6.7 Mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas

Neste estudo, a mutação mais frequente associada à resistência às fluoroquinolonas foi a Ala90Val no gene *gyrA*, tanto nas cepas do Brasil quanto nas de Moçambique.

A maioria das mutações já reconhecidas como associadas à resistência às fluoroquinolonas estão localizadas em uma região conservada do gene *gyrA*, sendo os códons 90 e 94 os mais frequentemente mutados (SUN et al., 2008).

Campbell et al. (2011) detectaram em sua casuística que as mutações Asp94Gly e Ala90Val foram as mais frequentes, com percentual de ocorrência entre isolados fenotipicamente resistentes à ofloxacina de 28,6 e 25,5% respectivamente.

Sirgel et al. (2012b) encontraram dado semelhante em seu trabalho, o qual evidenciou que mutações nos códons 94 e 90 foram as mais frequentes entre os isolados com resistência fenotípica. Também houve predomínio das mutações Asp94Gly e Ala90Val.

Witney et al. (2015) evidenciaram em seu trabalho que as mutações Ala90Val, Asp94Gly e Gly88Cys estavam associadas à resistência fenotípica nos isolados avaliados.

Namburete et al. (2016) encontraram resistência às fluoroquinolonas em 43,7% de 16 isolados resistentes a drogas provenientes de Moçambique. Todos apresentaram a mutação Ala90Val no gene *gyrA*.

Mutações distintas no gene *gyrA* impactam de maneira diferente nos valores de MIC para diferentes drogas da classe. Ofloxacina é uma fluoroquinolona

pertencente a uma geração antiga, porém ainda amplamente utilizada pelo baixo custo. Já a moxifloxacina é uma droga de desenvolvimento mais recente, de maior potência contra *M. tuberculosis* (SIRGEL et al., 2012b). Malik et al. (2012) demonstraram que a mutação Ala90Val associa-se a MICs mais baixos para moxifloxacina do que para ofloxacino, o que sugere a possibilidade de uso desta droga em altas doses. Também foi evidenciado neste estudo que mutações no códon 94 do gene *gyrA* associa-se a valores elevados de MIC para todas as drogas da classe.

Sirgel et al. (2012b) demonstraram que mutações nos códons 88 e 94 do gene *gyrA* estão associados a níveis mais altos de resistência a todas às fluoroquinolonas, quando comparados a mutações nos códons 89, 90 e 91.

6.8 Mutações associadas à resistência aos aminoglicosídeos injetáveis de segunda linha

A detecção de mutações associadas à resistência aos aminoglicosídeos de segunda linha ocorreu em apenas três isolados deste estudo. Nos isolados de Moçambique, não houve detecção de mutações pelo sequenciamento, porém o teste Genotype MTBDRsl evidenciou a mutação C14T no gene *eis* em um isolado. Nos isolados do Brasil, houve detecção de mutação intragênica no gene *rrs* pelo sequenciamento genômico e da mutação A1401G no gene *rrs* pelo teste Genotype MTBDRsl.

Campbell et al. (2011) encontraram maior frequência da mutação A1401G no gene *rrs* em isolados com resistência fenotípica aos aminoglicosídeos de segunda linha. Em relação à resistência a canamicina, houve detecção desta mutação em 55,9% dos isolados. Para amicacina, detectou-se esta mutação em 88,6% dos isolados, enquanto que para capreomicina esta mutação ocorreu em 49,3% dos isolados. A mutação C14T no gene *eis*, que confere baixo nível de resistência a canamicina, ocorreu em 9,9% dos isolados resistentes a esta droga.

Georghiou et al. (2012) realizaram revisão sistemática para avaliação de mutações gênicas associadas à resistência fenotípica à amicacina, canamicina e capreomicina. A mutação A1401G no gene *rrs* estava presente 78% dos isolados resistentes à amicacina, 76% dos isolados resistentes à capreomicina e em 56% daqueles resistentes à canamicina. Entre os isolados sensíveis, esta mutação foi

encontrada em 7% dos isolados sensíveis à capreomicina. Nesta revisão também foram avaliadas mutações no gene *eis*. A mutação G10A foi a mais frequentemente detectada, sendo encontrada em 22% dos isolados resistentes a canamicina, porém em 1% daqueles sensíveis a esta droga. A mutação C14T foi evidenciada em 11% dos resistentes a canamicina e em 9% dos resistentes a amicacina, não sendo evidenciada em isolados sensíveis.

Rodwell et al. (2014) avaliaram diferentes mutações gênicas para cálculo de sensibilidade e especificidade da sua associação com a resistência a drogas. A mutação A1401G no gene *rrs* apresentou sensibilidade para prever resistência a amicacina e capreomicina de 89 e 90% respectivamente. Porém, para canamicina a sensibilidade foi de 71%.

6.9 Limitações do estudo

É importante mencionar que o número pequeno de isolados de cada centro submetidos aos ensaios laboratoriais pode prejudicar a comparação dos resultados obtidos com dados disponíveis na literatura.

A falta de dados de sensibilidade por testes fenotípicos para pirazinamida e drogas de segunda linha (fluoroquinolonas e aminoglicosídeos) impediu a avaliação de concordância das mutações detectadas pelo sequenciamento com o teste considerado padrão ouro.

Outra consideração a ser feita refere-se à realização da revisão de prontuários médicos apenas do subgrupo de pacientes do Brasil, o que limitou a avaliação da terapêutica instituída e desfecho clínico com os resultados dos ensaios laboratoriais realizados.

7 Considerações finais

Apesar dos avanços consistentes no controle da tuberculose nas últimas décadas, ainda persiste o desafio do aumento crescente da resistência às drogas tuberculostáticas. Os mecanismos da resistência bacilar envolvem diversas mutações gênicas, ainda não completamente conhecidas, com diferentes impactos na resistência fenotípica, o que dificulta o aprimoramento e desenvolvimento de testes de sensibilidade acurados. Certamente, testes de sensibilidade, não só com elevada acurácia, como também de fácil e rápida execução e implementação descentralizada nas regiões de maior incidência da doença, são cruciais para promoção do controle da disseminação de cepas resistentes.

O sequenciamento genômico total possibilita enormes avanços na definição das mutações gênicas possivelmente associadas à resistência aos fármacos, com poder discriminatório superior às outras técnicas de tipagem molecular. Neste sentido, é bastante promissor para otimização do conhecimento dos complexos mecanismos de resistência do *M. tuberculosis*. Neste estudo, o sequenciamento genômico mostrou excelente desempenho, com acurácia superior aos testes genotípicos comerciais na detecção de resistência aos fármacos. Entretanto, seu uso ainda é limitado pela carência de bases de dados padronizadas para interpretação dos resultados, técnica de difícil execução e elevado custo.

É evidente a necessidade da realização do diagnóstico precoce e acurado da resistência bacilar, que tem grande potencial de impactar não só no tratamento efetivo e cura do indivíduo, mas principalmente na interrupção da cadeia de transmissão de bacilos resistentes, com consequente impacto na saúde da coletividade.

Referências

ACHTMAN, M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 62, p. 53-70, 2008.

ALLAND, D. et al. Transmission of tuberculosis in New York City: an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 330, n. 24, p. 1710-6, 1994.

ALMEIDA DA SILVA, P. E.; PALOMINO J. C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 66, n. 7, p. 1417-30, 2011.

ANDRE, E. et al. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpoB* gene mutations in pathogenic mycobacteria. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v. 23, n. 3, p. 167-72, 2017a.

ANDRE, E. et al. Novel rapid PCR for the detection of Ile491Phe *rpoB* mutation of *Mycobacterium tuberculosis*, a rifampicin-resistance-conferring mutation undetected by commercial assays. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v. 23, n. 4, p. 267.e5-267.e7, 2017b.

BAKONYTE, D. et al. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Lithuania. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 47, n. 6, p. 2009-11, 2003.

BARNARD, M. et al. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, New York, v. 177, n. 7, p. 787- 92, 2008.

BARNES, P. F.; CAVE, M.D. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.349, n.12, p. 1149-56, 2003.

BARNES, P. F.; LAKEY, D. L.; BURMAN, W. J. Tuberculosis in patients with HIV infection. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Maryland Heights, v. 16, n. 1, p. 107-26, 2002.

BECTON, DICKINSON AND COMPANY. **BACTEC MGIT 960 SIRE Kit para o teste da sensibilidade anti-micobacteriana do *Mycobacterium tuberculosis***. 2016. Disponível em: <<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=18306>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

BERTOLLI FILHO, C. **História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2001. 248p.

BLANCHARD, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 64, p. 215-39, 1996.

BOLLELA, V. R. et al. Detection of *katG* and *inhA* mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, Paris, v. 20, n. 8, p. 1099-104, 2016.

BÖTTGER, E. C. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v. 17, n. 8, p. 1128-34, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Bol. Epidemiol.**, Brasília, DF, v. 48, n.8, 2017. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/23/2017-V-48-N-8-Indicadores-priorit-rios-para-o-monitoramento-do-Plano-Nacional-pelo-Fim-da-Tuberculose-como-Problema-de-Sa-de-P-blica-no-Brasil.pdf>>. Acesso em: 3 nov. 2017.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v. 264, n. 1, p. 6-24, 2015.

BROSSIER, F. et al. Detection by genotype MTBDRs/ test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1683-9, 2010.

BROSSIER, F. et al. Molecular detection methods of resistance to antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. **Med. Mal. Infect.** Paris, v. 47, n. 5, p. 340-48, 2017.

BROWN, A. C. et al. Rapid whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates directly from clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 53, n. 7, p. 2230-7, 2015.

CAMBAU, E. et al. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study. **J. Antimicrob. Chemother.** London, v. 70, n. 3, p. 686-96, 2015.

CAMINERO, J. A. et al. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. **Lancet Infect. Dis.**, London, v. 10, n. 9, p. 621-9, 2010.

CAMPBELL, P. J. et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 55, n. 5, p. 2032-41, 2011.

CAVUSOGLU, C.; KARACA-DERICI, Y.; BILGIC A. In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v. 10, n. 7, p. 662-5, 2004.

CHAISSON, R. E.; NUERMBERGER, E. L. Confronting multidrug-resistant tuberculosis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 366, n. 23, p. 2223-4, 2012.

CHANG, K. C.; YEW, W. W.; ZHANG, Y. Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 55, n. 10, p. 4499-505, 2011.

CHATTERJEE, A. et al. Whole genome sequencing of clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Mumbai, India: a potential tool for determining drug-resistance and strain lineage. **Tuberculosis (Edinb)**, Edinburgh, v. 107, p. 63-72, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae* and other aerobic actinomycetes; approved standard**. 2nd ed. Wayne: CLSI, 2011. (CLSI document M24-A2).

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, London, v. 393, n. 6685, p. 537-44, 1998.

COLL, F. et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. **Genome Med.**, London, v. 7, n. 1: 51, 2015.

CROFTON, J.; MITCHISON, D. A. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. **Br. Med. J.**, London, v. 2, n. 4588, p. 1009-15, 1948.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respir. Med.**, London, v. 100, 1862–70, 2006.

DE ROSSI, E.; AÍNSA, J. A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 36-52, 2006.

DIERBERG, K. L.; CHAISSON, R. E. Human Immunodeficiency Virus - associated tuberculosis update on prevention and treatment. **Clin. Chest Med.**, Philadelphia, v. 34, n. 2, p. 217-28, 2013.

DOMINGUEZ, J. et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, Paris, v. 20, n. 1, p. 24-42, 2016.

FEUERRIEGEL, S.; KÖSER, C.U.; NIEMANN, S. Phylogenetic polymorphisms in antibiotic resistance genes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 69, n. 5, p. 1205-10, 2014.

FRIEDRICH, S. O. et al. Assessment of the sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF assay as an early sputum biomarker of response to tuberculosis treatment. **Lancet Respir. Med.**, Kidlington, v. 1, n. 6, p. 462-70, 2013.

GAGNEUX, S. et al. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, Washington, v.312, n. 5782, p. 1944-6, 2006.

GAGNEUX, S.; SMALL, P.M. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v. 5, n. 5, p. 328-37, 2007.

GEORGHIOU, S. B. et al. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e33275, 2012.

GILLESPIE, S. H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 46, n. 2, p. 267-74, 2002.

GILLESPIE, S. H. Tuberculosis: evolution in millennia and minutes. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 35, n. 5, p. 1307-20, 2007.

HAIN LIFESCIENCE. **Genotype MTBDRplus ver 2.0. Instructions for use 2012.** Disponível em: <https://www.ghdonline.org/uploads/MTBDRplusV2_0212_304A-02-02.pdf>. Acesso em: 3 nov. 2017.

HAIN LIFESCIENCE. **Genotype MTBDRsl ver 2.0. Instructions for use 2015.** Disponível em: <https://www.immunodiagnostic.fi/wp-content/uploads/MTBDRsl-V2_kit-insert.pdf>. Acesso em: 3 nov. 2017.

HAZBÓN, M. H. et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 50, n. 8, p. 2640-9, 2006.

HEEP, M. et al. Rifampin and rifabutin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 43, n. 6, p. 1497-9, 1999.

HIJJAR, M. A. et al. Epidemiologia da tuberculose. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 310-4, 2005.

HILLEMANN, D.; RUSCH-GERDES, S.; RICHTER, E. Evaluation of the Genotype MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 45, n. 8, p. 2635-40, 2007.

HILLEMANN, D.; RUSCH-GERDES, S.; RICHTER, E. Feasibility of the GenoType MTBDRs/ assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 47, n. 6, p. 1767-72, 2009.

HILLEMANN, D. et al. First evaluation after implementation of a quality control system for the second line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* joint efforts in low and high incidence countries. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e76765, 2013.

HORNE, D. J. et al. Diagnostic accuracy and reproducibility of WHO-endorsed phenotypic drug susceptibility testing methods for first-line and second-line antituberculosis drugs. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 51, n. 2, p. 393-401, 2013.

HOSHIDE, M. et al. Geographical differences associated with single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in nine gene targets among resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 52, n. 5, p. 1322-9, 2014.

ILLUMINA SUPPORT CENTER. 2017. Disponível em: <<https://support.illumina.com/>>. Acesso em: 4 nov. 2017.

JACOBSON, K. R. et al. Treatment outcomes of isoniazid-resistant tuberculosis patients, Western Cape Province, South Africa. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 53, n. 4, p. 369-72, 2011.

JAGIELSKI, T. et al. Screening for streptomycin resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e100078, 2014.

JAMIESON, F. B. et al. Profiling of *rpoB* mutations and MICs for rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 52, n. 6, p. 2157-62, 2014.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 123, n. 1-2, p. 11-8, 1994.

JOSEPH, B. V. et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kerala, India using IS6110-RFLP, spoligotyping and MIRU-VNTRs. **Infect. Genet. Evol.**, Amsterdam, v. 16, p. 157-64, 2013.

KESHAVJEE, S.; FARMER, P. E. Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 367, n. 10, p. 931-6, 2012.

KREMER, K. et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 8, p. 2607-18, 1999.

KRITSKI, A. L. Emergência de tuberculose resistente: renovado desafio. **J. Bras. Pneumol.**, Brasília, DF, v. 36, n. 2, p. 157-8, 2010.

KUMAR, S.; JENA, L. Understanding Rifampicin Resistance in Tuberculosis through a Computational Approach. **Genomics Inform.**, Seoul, v. 12, n. 4, p. 276-82, 2014.

LACOMA, A. et al. GenoType MTBDR_{plus} assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 46, n. 11, p. 3660-7, 2008.

LAERSEN, M. H. et al. Genetic Manipulation of *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr. Protoc. Microbiol.**, New York, Chapter 10: Unit 10A.2 , 2007.

LANGE, C. et al. Management of patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. **Eur. Respir. J.**, Sheffield, v. 44, n. 1, p. 23-63, 2014.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **Lancet**, London, v. 378, n. 9785, p. 57-72, 2011.

LIN, S. Y.; DESMOND, E. P. Molecular diagnosis of tuberculosis and drug resistance. **Clin. Lab. Med.**, Philadelphia, v. 34, n. 2, p. 297-314, 2014.

MALIK, S. et al. New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e39754, 2012.

MANTEN, A.; VAN WIJNGAARDEN, L.J. Development of drug resistance to rifampicin. **Chemotherapy**, Basel, v. 14, n. 2, p. 93-100, 1969.

MC ALISTER, A. J.; DRISCOLL, J.; METCHOCK, B. DNA sequencing for confirmation of rifampin resistance detected by cepheid Xpert MTB/ RIF assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 53, n. 5, p. 1752-3, 2015.

MDLULI, K. et al. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. **Science**, Washington, v. 280, n. 5369, p. 1607-10, 1998.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nat. Rev. Genet.**, London, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

MIOTTO, P. et al. GenoType MTBDRplus: a further step toward rapid identification of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 46, n. 1, p. 393-4, 2008.

MIOTTO, P. et al. GenoType MTBDRsl performance on clinical samples with diverse genetic background. **Eur. Respir. J.**, Sheffield, v. 40, n. 3, p. 690-8, 2012.

MOKADDAS, E. et al. Discordance between Xpert MTB/RIF assay and Bactec MGIT 960 culture system for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a country with a low tuberculosis (TB) incidence. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 53, n. 4, p. 1351-4, 2015.

MOKROUSOV, I. et al. Detection of *embB* mutations in ethambutol susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: implications for genotype resistance testing. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, n. 10, p. 3810-3, 2002.

MORLOCK, G. P. et al. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 44, n. 9, p. 2291-5, 2000.

MUSSER, J. M. et al. Characterization of the Catalase-Peroxidase Gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 173, n. 1, p. 196-202, 1996.

NAMBURETE, E. I. et al. Drug-resistant tuberculosis in Central Mozambique: the role of a rapid genotypic susceptibility testing. **BMC Infect. Dis.**, London, v. 16, p. 423, 2016.

NEBENZAHL-GUIMARAES, H. et al. Systematic review of allelic exchange experiments aimed at identifying mutations that confer drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 69, n. 2, p. 331-42, 2014.

NGUYEN, L.; THOMPSON, C.J. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 14, n. 7, p. 304-12, 2006.

NICOLAU, I. et al. Research questions and priorities for tuberculosis: a survey of published systematic reviews and meta- analyses. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e42479, 2012.

NIEMANN, S. et al. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints. **PloS One**, San Francisco, v.4, n.10, p. e7407, 2009.

OHNO, H. et al. Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 40, n. 4, p. 1053-6, 1996.

PABLOS-MÉNDEZ, A. et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 338, n. 23, p. 1641-9, 1998.

PANKHURST, L. J. et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. **Lancet Respir. Med.**, Kidlington, v. 4, n. 1, p. 49-58, 2016.

PAPAVENTSIS, D. et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v. 23, n. 2, p. 61-8, 2017.

PHELAN, J. et al. The variability and reproducibility of whole genome sequencing technology for detecting resistance to anti-tuberculous drugs. **Genome Med.**, London, v. 8, n. 1, p. 132, 2016.

PIERSIMONI, C. et al. Current perspectives on drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex: the automated nonradiometric systems. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 44, n. 1, p. 20-8, 2006.

RAMASWAMY, S.; MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. **Tuber. Lung Dis.**, Edinburgh, v. 79, n. 1, p. 3-29, 1998.

RAMASWAMY, S. V. et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 44, n. 2, p. 326-36, 2000.

RAWAT, R.; WHITTY, A.; TONGE, P. J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 100, n. 24, p. 13881-6, 2003.

RUFFINO-NETTO, A. Impacto da reforma do setor saúde sobre os serviços de tuberculose no Brasil. **Bol. Pneumol. Sanit.**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 7-18, 1999.

SAFI, H. et al. Transfer of embB codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 52, n. 6, p. 2027-34, 2008.

SAFI, H. et al. Allelic exchange and mutant selection demonstrate that common clinical embCAB gene mutations only modestly increase resistance to ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 54, n. 1, p. 103-8, 2010.

SAN PEDRO, A.; OLIVEIRA, R. M. Tuberculose e indicadores socioeconômicos: revisão sistemática da literatura. **Rev. Panam. Salud Publica**, Washington, v. 33, n. 4, p. 294-301, 2013.

SELIKOFF, I. J.; ROBITZEK, E. H.; ORNSTEIN, G. G. Treatment of pulmonary tuberculosis with hydrazide derivatives of isonicotinic acid. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v. 150, n. 10, p. 973-80, 1952.

SHAH, N. S. et al. Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 13, n. 3, p. 380-7, 2007.

SIRGEL, F. A. et al. embB306 mutations as molecular indicators to predict ethambutol susceptibility in Mycobacterium tuberculosis. **Chemotherapy**, Los Angeles, v. 58, n. 5, p. 358-63, 2012a.

SIRGEL, F. A. et al. gyrA mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 67, n. 5, p. 1088-93, 2012b.

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. **J. Bras. Pneumol.**, Brasília, DF, v. 35, n. 1, p. 54-62, 2009.

SOTGIU, G.; MIGLIORI, G. B. Facing multi-drug resistant tuberculosis. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, London, v. 32, p. 144-8, 2015.

SPRINGER, B. et al. Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.45, n. 10, p. 2877-84, 2001.

SREEVATSAN, S. et al. Characterization of rpsL and rrs mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from diverse geographic localities. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 40, n. 4, p. 1024-6, 1996.

STEINGART, K. R. et al. **Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review)**. London: The Cochrane Library, 2013. 129 p.

SUN, Z. et al. Comparison of gyrA gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains and clinical isolates. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 115-21, 2008.

SUN, G. et al. Dynamic population changes in Mycobacterium tuberculosis during acquisition and fixation of drug resistance in patients. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 206, n. 11, p. 1724-33, 2012.

SUPPLY, P. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 44, n. 12, p. 4498-510, 2006.

TAKAYAMA, K. et al. Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 16, n. 2, p. 240-2, 1979.

TAKIFF, H. E. et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* *gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 38, n. 4, p. 773-80, 1994.

TELENTI, A. et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Lancet**, London, v. 341, n. 8846, p. 647-50, 1993.

THERON, G. et al. GenoType® MTBDRsl assay for resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. **Cochrane Database Syst Rev.**, Chichester, 2016. In press.

THWAITES, G. et al. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 46, n. 4, p. 1363-8, 2008.

TRAORE, H. et al. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, Paris, v. 4, n. 5, p. 481-4, 2000.

TRUNZ, B. B.; FINE, P.; DYE, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. **Lancet**, London, v. 367, n. 9517, p. 1173-80, 2006.

TUDÓ, G. et al. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 65, n. 11, p. 2341-6, 2010.

UNISSA, A. N. et al. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Genet. Evol.**, Amsterdam, v. 45, p. 474-92, 2016.

VAN DEUN, A. et al. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 51, n. 8, p. 2633-40, 2013.

VIJDEA, R. et al. Multidrug-resistant tuberculosis: rapid detection of resistance to rifampin and high or low levels of isoniazid in clinical specimens and isolates. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Berlin, v. 27, n. 11, p. 1079-86, 2008.

WALKER, T. M. et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v. 15, n. 10, p. 1193-202, 2015.

WERNGREN, J. et al. Reevaluation of the critical concentration for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide using wild-type MIC distributions and *pncA* gene sequencing. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 56, n. 3, p. 1253-7, 2012.

WITNEY, A. A. et al. Clinical application of whole-genome sequencing to inform treatment for multidrug-resistant tuberculosis cases. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 53, n. 5, p. 1473-83, 2015.

WITNEY, A. A. et al. Clinical use of whole genome sequencing for *Mycobacterium tuberculosis*. **BMC Med.**, London, v. 14, n. 46, 2016.

WONG, S. Y. et al. Mutations in *gidB* confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 55, n. 6, p. 2515-22, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB)**. Geneva: WHO, 2008a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Policy guidance on drug susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs**. Geneva: WHO, 2008b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The global plan to Stop TB 2011-2015**. Geneva: WHO, 2010a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Treatment of tuberculosis guidelines**. 4th ed. Geneva: WHO, 2010b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system**. Geneva: WHO, 2011a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for Intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource constrained settings**. Geneva: WHO, 2011b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The end TB strategy - global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015**. Geneva: WHO, 2014a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis**. Geneva: WHO, 2014b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global tuberculosis report 2017**. Geneva: WHO, 2017.

ZHANG, Y. et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, London, v. 358, n. 6387, p. 591-3, 1992.

ZHANG, Y. et al. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 52, n. 5, p. 790-5, 2003.

ZHANG, Y.; MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, Paris, v. 7, n. 1, p. 6-21, 2003.

ZHANG, H. et al. Mutations found in the *pncA* gene of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical pyrazinamide-resistant isolates from a local region of China. **J. Int. Med. Res.**, London, v. 37, n. 5, p. 1430-5, 2009.

Apêndices

APÊNDICE A

Artigo publicado sobre dados obtidos no projeto piloto desta pesquisa

BRAZ J INFECT DIS 2016;20(3):290-293

The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid

Brief communication

Evaluation of resistance acquisition during tuberculosis treatment using whole genome sequencing

Cinara Silva Feliciano^a, Jessica Rodrigues Praça^c, Kamila Peronni^{b,c},
Wilson Araújo Silva Jr^{b,c}, Valdes Roberto Bollela^{a,c,*}

^a Department of Internal Medicine, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Genetics, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Center for Medical Genomics, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2015

Accepted 5 January 2016

Available online 20 March 2016

Keywords:

Tuberculosis

Drug resistant tuberculosis

Drug susceptibility tests

Whole genome sequencing

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is still considered a major global public health problem in the world and there is a concern about the worldwide increase of drug-resistance (DR). This paper describes the analysis of three *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a single patient collected over a long treatment period of time. DR was initially investigated through phenotypic testing, followed by line probe assays (LPAs) and whole genome sequencing (WGS). It presents an intriguing situation where a multidrug-resistant (MDR-) TB case was diagnosed and treated based only on late phenotypic drug susceptibility testing of isolate 1. During the treatment, another two isolates were cultivated: isolate 2, nine months after starting MDR-TB treatment; and isolate 3, cultivated five months later, during regular use of anti-TB drugs. These two isolates were evaluated using molecular LPA and WGS, retrospectively. All mutations detected by LPA were also detected in the WGS, including conversion from fluoroquinolones susceptibility to resistance from isolate 2 to isolate 3. WGS showed additional mutations, including some which may confer resistance to other drugs not tested (terizidone/cycloserine) and mutations with no correspondent resistance in drug susceptibility testing (streptomycin and second-line injectable drugs).

© 2016 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Tuberculosis (TB) is still considered a major global public health problem, and Brazil is the 16th country in absolute number of cases. Despite consistent advances achieved with control measures, there are still major challenges to face the growing resistance to anti-tuberculosis drugs in several countries, including Brazil.¹ Molecular epidemiology

studies of *M. tuberculosis* have gained emphasis among clinical researchers. New knowledge on the TB pathogenesis and its causative agent could be the key to the development of new control strategies.^{2,3} Recently, the World Health Organization set the Global "Stop TB Plan" to find patients harboring resistant strains of *M. tuberculosis*. This initiative has been

* Corresponding author.

E-mail address: vbollela@gmail.com (V. Roberto Bollela).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.01.004>

1413-8670/© 2016 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

important to test first-line TB drugs and promoting research to develop new drugs, vaccines, and diagnostic strategies.^{1,4}

Among the techniques used, whole genomic sequencing (WGS) is worth mentioning, especially for the investigation of bacilli resistance. This approach enables accurate assessment of mutations related to bacilli resistance to several TB drugs. This information would allow the development of new diagnostic methods and therapeutic strategies applied for disease control.⁵

Outhred et al. advocate the use of WGS for all multidrug-resistant *M. tuberculosis* isolates as an alternative plan to improve patient care, monitor for transmission events, and contribute to better understanding of resistance-associated mutations.⁶

This study describes a challenging case of treatment failure of a patient under MDR-TB therapy and reports phenotypic and molecular drug resistance test results in correlation to mutations identified with a whole genome sequencing analysis.

Three isolates of *M. tuberculosis* from a single patient, during different time points of his treatment, were evaluated based on phenotyping and genotyping testing: isolate 1 was collected before the patient started the follow-up in the reference center, when clinical and microbiological failure was diagnosed, despite regular TB treatment with rifampicin (R), isoniazid (H), pyrazinamide (Z) and ethambutol (E); isolate 2 was collected in the ninth month of MDR-TB treatment (other clinical and microbiological failure); and isolate 3 was obtained on the 13th month of MDR-TB treatment.

A nonradiometric phenotypic susceptibility testing was performed in liquid medium (MGIT 960; Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) for isolate 1. Besides this susceptibility phenotypic testing, two line probe assays (LPA), Genotype MTBDRplus and MTBDRsl (Hain Lifescience, GmbH, Germany), were performed in isolates 2 and 3. Genotype MTBDRplus evaluates the main mutations associated with rifampicin (rpoB gene mutations) and isoniazid (katG e inhA mutations) resistance. Genotype MTBDRsl detects mutations related with resistance to fluoroquinolones (gyrA gene mutations), second-line injectable drugs (SLID) (rrs gene mutations) and ethambutol (embB gene mutations).^{7,8} Finally, the two stored samples (isolates 2 and 3) were submitted to WGS analysis using Illumina MiSeq Sequencing System (Illumina, San Diego, CA, USA). LPAs and WGS tests were performed with stored isolates 2 and 3 at the end of the patient's treatment. Therefore, this information was not available to the clinician during the treatment. Isolate 1 was not tested again because it was not viable.

Generated reads with phred scale score superior to 30 was mapped with BWA v0.7.5a program (Burrows-Wheeler Alignment Tool) using the reference genome *M. tuberculosis* H37Rv. Conversion from sequence alignment map format to sorted, indexed BAM files was done using SAMtools (version 0.1.19). PCR-duplicates were removed using the MarkDuplicates option of the Picard software tools (version 1.61). The variants were found according to the pipeline SAMtools/BCFtools v 0.1.18 and annotated with SnpEff v 4.0. Databases TB Drug Resistance Mutation Database⁹ and *M. tb* Drug Resistance Directed Sequencing Database¹⁰ were used to identify mutations described for the TB bacilli. All detected mutations

were confirmed based on TB profiler online tool, described by Coll et al.,¹¹ to remove single nucleotide polymorphisms (SNPs) at drug resistance loci which were historically misclassified as drug resistance markers.

This project was approved by the Ethics and Research Committee of the Hospital of the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (protocol number: 944117 – February 1, 2015).

The patient was initially treated with RHZE for six months. During the last month clinical and microbiological failure (acid-fast smear positive and respiratory symptoms) was diagnosed. This *M. tuberculosis* isolate showed R and H resistance in the first phenotypic susceptibility testing. The patient was referred to the regional TB drug resistance center and his treatment was switched to streptomycin (Sm), E, ofloxacin (FQ), Z, and terizidone (Tz), following the Brazilian guidelines for the management of MDR-TB. During the first nine months of treatment, there was a transient improvement followed by recurrence of symptoms. Sputum culture was collected and the same MDR-TB treatment was maintained until the 13th month. The therapy was empirically optimized by adding ethionamide, extending the period of streptomycin and increasing the local support for directly observed treatment, while the results of phenotypic testing from isolate 3 were still pending. The treatment was successfully completed after 24 months, with clinical and microbiological cure. After that, instigated by this unusual and intriguing case and its outcome, we decided to carry on molecular studies on the patient's isolates 2 and 3.

Isolate 1 showed resistance to R and H in the phenotypic test. Phenotypic testing of isolate 2 showed resistance to these two drugs and also to Z. The LPA of this isolate showed resistance to R (lost wild type 8 and gained rpoB S450L mutation), H (lost wild type and gained KatG S315T1 mutation), and E (lost wild type 1 and gained embB M306V mutation). Isolate 3 showed resistance to R, I, E (same mutations described in isolate 2), and acquired a new resistance pattern to FQ (gyrA D94G mutation) in the LPA test. Phenotypic testing of isolate 3, which became available close to the end of the patient's treatment, showed resistance to the above mentioned drugs and also to Z. The critical concentrations of Bactec-MGIT 960^{1M} reported by the manufacturer's drug susceptibility testing (DST) protocol were as follows: H: 0.10 µg/mL; R: 1.0 µg/mL; EM: 5.0 µg/mL; Sm: 1.0 µg/mL; Z: 100 µg/mL; FQ (ofloxacin): 2 µg/mL; Amikacin 1.0 µg/mL; Capreomycin 2.5 µg/mL. The susceptibility profile of isolates in the phenotypic test and LPA are described in Table 1.

The WGS analysis of these two strains generated the total of 43,036,497 reads (28,171,267 for strain 1 and 14,865,230 for strain 2), with an average coverage of 469× for the isolate 2 and 244× for the isolate 3. Bioinformatics analysis reported 11 mutations already described as associated with resistance in isolate 2 and 12 mutations in isolate 3 (Table 2). Additional mutation in gyrA gene (D94G) was identified in isolate 3, which is one of the most frequent mutations associated with resistance to FQ, and is tested by the LPA Genotype MTBDRsl. Although all mutations showed by LPA were validated by WGS, additional mutations were detected, including those conferring resistance to other drugs despite bacilli susceptibility demonstrated in the phenotypic drug susceptibility testing

Table 1 – Results of phenotypic and LPA tests: susceptibility profile of tested drugs.

	Isolate 1 detected resistance	Isolate 2 detected resistance	Isolate 3 detected resistance
Phenotypic drug susceptibility testing (DST)	Rifampicin; Isoniazid ^a	Rifampicin; Isoniazid; Pyrazinamide ^b	Rifampicin; Isoniazid Ofloxacin; Pyrazinamide Ethambutol ^c
Genotype MTBDRplus (R; H)	NA	Rifampicin Isoniazid	Rifampicin Isoniazid
Genotype MTBDRsl (E; FQ; SLID)	NA	Ethambutol	Ethambutol FQ
WGS	NA	Available (see Table 2)	Available (see Table 2)

NA, not available; R, rifampicin; H, isoniazid; E, ethambutol; FQ, fluoroquinolones; SLID, second line injectable drugs.
^a Isolate 1 collected before MDR-TB treatment – susceptible to E and Sm. SLID not tested.
^b Isolate 2 collected in the ninth month of MDR-TB treatment – susceptible to E, SLID and FQ.
^c Isolate 3 collected on the 13th month of MDR-TB treatment – susceptible to Sm and SLID.

Table 2 – Whole genomic sequencing mutations identified in isolates 2 and 3.

Gene	Associated drug	Genomic position	Mutation	Strain 2 mutation	Strain 3 mutation	Reference allele	Mutated allele	Variant type
gyrA	Fluoroquinolones	7362	E21Q	Yes	Yes	G	C	Missense
gyrA	Fluoroquinolones	7582	D94C ^a	No	Yes	A	G	Missense
rpoB	Rifampicin	759939	P45T	Yes	Yes	C	A	Missense
rpoB	Rifampicin	761155	S450L	Yes	Yes	C	T	Missense
rpsL	Streptomycin	781395	–	Yes	Yes	T	C	Promoter gene
tlyA	Aminoglycosides	1917972	L11L	Yes	Yes	A	G	Synonymous
katG	Isoniazid	2154915	E399E	Yes	Yes	A	G	Synonymous
katG	Isoniazid	2155168	S315T	Yes	Yes	G	C	Missense
pncA	Pyrazinamide	2289039	W68L	Yes	Yes	G	T	Missense
alr	Cycloserine	3840719	L234L	Yes	Yes	A	G	Synonymous
alr	Cycloserine	3841403	E6D	Yes	Yes	G	T	Missense
embB	Ethambutol	4247429	M306V	Yes	Yes	A	G	Missense

^a Mutation detected only in the isolate 3, by whole genomic sequencing.
 Except for mutation D94C, the SNPs reads for isolate 2 and 3 were 100% identical, with no signs of heteroresistance.

(gyrA E21Q in isolate 2, rpsL promoter gene in genomic position 781395, tlyA L11L for isolates 2 and 3).

The relation between genome mutations and phenotypic resistance is particularly important for therapeutic decision, because different mutations can cause different resistance profiles or not even cause any phenotypic resistance.¹² Coll et al. compiled a library of mutations predictive of drug resistance, and removed phylogenetic SNPs at drug resistance loci, which were historically misclassified as drug resistance markers.¹¹

WGS has great application potential to detect bacilli resistance in clinical practice. However, further work is needed to determine additional resistance polymorphisms as it should be noted that high positive predictive values are crucial for drug resistance tests where the consequence of a false positive result may lead to unnecessary treatment and prolonged patient isolation.¹¹

The WGS of *M. tuberculosis* is a great advance in the knowledge of bacilli resistance, as well as in the clinical management of TB. This technique presents greater discriminatory power, enabling analysis of additional mutations, not possible to be assessed by other methods. WGS has the potential for clinical use, as mentioned by other authors^{5,11-14} for fast and accurate assessments in cases of illness caused by strains resistant

to multiple drugs, with an impact on therapeutic decisions. However, this is a high-cost technology and it is still critical to understand and standardize correlations between genotypic and phenotypic resistance to really optimize its clinical use.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.
2. Gomes HM, Elias AR, Oelemann MAC, et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect Genet Evol*. 2012;12(4):649–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.027>. Epub 2011 Sep 1.
3. García De Viedma D, Mokrousov I, Rastogi N. Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2011;29 Suppl 1:8–13. [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70012-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70012-X).

4. World Health Organization (WHO). The global plan to stop TB 2011-2015. Geneva: World Health Organization; 2010.
5. Ilina EN, Shitikov EA, Ikryannikova LN, et al. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistant strains from Russia. *PLoS One*. 2013;8:e56577.
6. Outhred AC, Jefs P, Suliman B, et al. Added value of whole genome sequencing for management of highly drug-resistant TB. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(4):1198-202.
7. World Health Organization (WHO). Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB). Geneva: World Health Organization; 2008.
8. Brossier F, Veziris N, Aubry A, et al. Detection by genotype MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1683-9.
9. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, et al. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med*. 2009;6:e2.
10. Broad Institute. Available at: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/mtb_drug_resistance.1/MultiHome.htm.
11. Coll F, McNeerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med*. 2015;7:51.
12. Witney AA, Gould KA, Arnold A, et al. Clinical application of whole-genome sequencing to inform treatment for multidrug-resistant tuberculosis cases. *J Clin Microbiol*. 2015;53:1473-83.
13. Liu F, Hu Y, Wang Q, et al. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *BMC Genomics*. 2014;15:469.
14. Clark TG, Mallard K, Cell F, et al. Elucidating emergence and transmission of multidrug-resistant tuberculosis in treatment experienced patients by whole genome sequencing. *PLoS One*. 2013;8:e83012.

APÊNDICE B

Artigo submetido para publicação sobre os resultados finais desta pesquisa

1 **TITLE:**

2 Whole Genome Sequencing versus phenotypic (MGIT) and commercial molecular tests for drug-
3 resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in Brazil and Mozambique.

4

5 **Authors name and affiliations:**

6 Cinara Silva Feliciano¹

7 Evangelina Namburete¹

8 Jéssica Rodrigues Praça²

9 Kamila Peronni²

10 Anzaan Dippenaar³

11 Robin Mark Warren³

12 Wilson Araújo Silva Jr^{2,4}

13 Valdes Roberto Bollela^{1,2}

14

15 **Affiliations:**

16 ¹Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (FMRP-USP),
17 Brazil.

18 ²Center for Medical Genomics, Clinics Hospital at Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo
19 (FMRP-USP), Brazil.

20 ³DST/NRF Centre of Excellence for Biomedical Tuberculosis Research, SAMRC Centre for Tuberculosis
21 Research, Division of Molecular Biology and Human Genetics, Faculty of Medicine and Health Sciences,
22 Stellenbosch University, South Africa.

23 ⁴Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (FMRP-USP), Brazil.

24

25 **Corresponding author information:**

26 E-mail address: vbollela@fmrp.usp.br; vbollela@gmail.com

27 Postal address:

28 Valdes Roberto Bollela MD; PhD

29 Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (FMRP-USP). Avenida Bandeirantes 3900.

30 Monte Alegre. CEP: 14049-900. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

31 Tel number: +55 16 3602-2468.

32

33

34

35

36

37

38

39

ABSTRACT:

The accurate diagnosis of drug-resistant tuberculosis (DR-TB) is critical to reducing the spread of disease. Although commercial genotypic drug-susceptibility tests (DST) are close to this goal, they are not able to detect all relevant DR-TB related mutations. Whole genome sequencing (WGS) allows better comprehension of DR-TB. We aimed to evaluate WGS in *M. tuberculosis* isolates compared with phenotypic and genotypic DST. This cross-sectional study evaluated 30 isolates from patients with detected DR-TB in Brazil and Mozambique. All the isolates were evaluated with phenotypic (MGIT-SIRE™) and genotypic (Xpert-MTB/RIF™, Genotype-MTBDRplus™ and MTBDRsl™) DST. Isolates with resistance to at least one first- or second-line drug were submitted to WGS and analyzed with TB profiler database. There was a great concordance with phenotypic DST for rifampicin and streptomycin (89.6%), isoniazid (96.5%) and ethambutol (82.7%). WGS sensitivity and specificity for detection resistance were respectively 87.5 and 92.3% for rifampicin; 95.6 and 100% for isoniazid. Two isolates from Mozambique showed Val170Phe *rpoB* mutation which was not detected by genotypic DST. WGS was able to provide all the relevant information about *M. tuberculosis* drug susceptibility in a single test and also detected Val170Phe *rpoB* mutation which is not covered by commercial genotypic DST.

Key words: drug-resistant tuberculosis; whole genome sequencing; next generation sequencing clinical diagnostics; antimicrobial susceptibility testing.

1. Introduction

In 2016, globally there were an estimated 10.4 million incident cases of tuberculosis (TB), 1.3 million TB-related deaths among HIV-negative and 374.000 deaths among HIV-positive people [1]. Despite this, the disease caused by drug-resistant (DR) strains is increasing and thereby undermining efforts to eradicate TB in many countries [2]. From 1998 to 2015, the concept of a high-burden country (HBC) became familiar and widely used in the context of TB. In 2015, three HBC lists – for TB, TB/HIV and multidrug-resistant TB (MDR-TB) – were in use. Mozambique is included in all these lists and Brazil is in the TB and TB/HIV lists [1]. Global data from 2016 estimated 490.000 new MDR-TB cases and around 50% related deaths. Information about DR-TB in Brazil and Mozambique is scarce, mainly due to the lack of laboratory facilities for drug susceptibility tests (DST) [1]. New accurate and rapid diagnostic strategies for drug-resistance are urgently required to ensure that patients are diagnosed early and initiated onto appropriate therapy to improve outcomes and prevent the spread of DR bacilli [3-6]. Currently, phenotypic DST are the gold standard for diagnosis of drug resistance, however they are time-consuming, require expensive laboratory facilities, are not available in many HBC and are not standardized for all anti-TB drugs [7-9].

Recently World Health Organization (WHO) endorsed three rapid genetic-based DST: Xpert-MTB/RIF, MTBDR_{plus} and MTBDR_{sl} line-probe assays [1]. Although these tests are fast and easy to perform, they are not able to detect all the mutations associated with DR-TB [10-12]. Whole genome sequencing (WGS) allows the analysis of nearly the entire genome of *Mycobacterium tuberculosis*, thereby enabling the identification of all mutations conferring resistance, mutations modifying resistance, mutations compensating for fitness cost as well as providing an extremely high discriminatory power to measure transmission of *M. tuberculosis* [13-15]. The development of next generation sequencing technologies has reduced costs and time required to sequence the *M. tuberculosis* genome, making it progressively more affordable to study the epidemiology of disease as well as to describe the mechanisms of drug resistance [16]. However, the development and standardization of robust platforms to enable reliable analysis and interpretation of WGS data remains to be achieved [8,17,18].

We aimed to use WGS to describe the mutations conferring resistance in clinical isolates of *M. tuberculosis* from Brazil and Mozambique and to compare these results to those obtained by phenotypic and commercial genotypic DST.

96 2. Material and methods

97 2.1 Study design and population

98 This is a cross-sectional study evaluating DR isolates from Southeastern Brazil and
99 Central Mozambique. All the isolates were tested with phenotypic (MGIT 960 SIRE kit),
100 commercial genotypic DST and were submitted to WGS if resistance was detected to at
101 least one first- or second-line drug by one of these tests from 2013 to 2016.

102 2.2 Drug-susceptibility tests

103 Phenotypic DST was conducted using MGIT-960 SIRE kit (MGIT-960; Becton
104 Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD). The critical concentrations reported by the
105 manufacturer's DST protocol were as follows: isoniazid (H): 0.10 g/mL; rifampicin (R):
106 1.0g/mL; ethambutol (E): 5.0g/mL; streptomycin (Sm): 1.0g/mL [19].

107 Molecular DST was performed using the Genotype-MTBDRplus 2.0 and MTBDRsl
108 2.0 (HainLifescience, GmbH, Germany) according to the manufacturer's instructions.
109 MTBDRplus evaluates mutations in the *rpoB* (rifampicin resistance); *katG* and *inhA* genes
110 (isoniazid resistance) [20, 21], while the MTBDRsl detects mutations related to resistance
111 to fluoroquinolones (*gyrA* and *gyrB* genes mutations) and second-line injectable drugs (*rrs*
112 and *eis* gene mutations) [22]. Later, all the isolates were also tested with Xpert-MTB/RIF
113 (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) according to the manufacturer's instructions [23].

114 2.3 Genomic DNA extraction and whole genome sequencing

115 The cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-lysozyme method was used for
116 genomic DNA extraction and purification in sub-cultured isolates [24]. The DNA
117 concentrations were measured using Nanodrop and then checked by agarose gel
118 electrophoresis. The WGS was performed using Illumina MiSeq Sequencing System
119 MiSeqV2-500 cycles (Illumina, San Diego, CA, USA). DNA library was prepared using
120 Nextera XT library preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Sequencing was
121 performed using MiSeq reagent kit V2 in a MiSeq sequencer as per manufacturer's
122 protocol (Illumina, San Diego, CA, USA) [25], producing paired-end read 2 x 250, with
123 read length of 500bp. Whole genome sequences were deposited to the European
124 Nucleotide Archive and are available under accession number: PRJEB23648.

125 2.4. WGS data analysis

126 Reads with phred quality score ≥ 30 were mapped with BWA v 0.7.5a (Burrows-
127 Wheeler Alignment Tool) using the *M. tuberculosis* H37Rv reference genome. Conversion

128 from sequence alignment map (SAM) format to sorted, indexed binary alignment map
 129 (BAM) files was done using SAM tools (version 0.1.19) [26]. PCR-duplicates were
 130 removed using the Mark Duplicates option of the Picard software tools (version 1.61). The
 131 variants were identified with SAMtools/ BCFtools v 0.1.18 and annotated with SnpEff v 4.0.

132 Reads were analyzed with a customized pipeline comprised of open source
 133 software as described previously [27]. Briefly, trimmomatic was used to remove adapters
 134 and low-quality bases (phred quality score of less than 20) using a sliding window
 135 approach, and filtering for a minimum read length of 36 [28]. Trimmed and filtered reads
 136 were aligned to the *M. tuberculosis* H37Rv (Genbank: AL123456.3) reference genome
 137 using three different alignment tools: the BWA [26], Novoalign (Novocraft) and SMALT
 138 [29]. The alignment files were subjected to local realignment around insertions and
 139 deletions (indels) and de-duplication using the Genome Analysis Toolkit (GATK) [30] and
 140 Picard Tools [31], respectively. Genomic variants (single nucleotide polymorphisms and
 141 indels) in coding and non-coding regions were identified from each alignment file using
 142 GATK [30] and SAMTools [26]. Variants identified in all three alignments by both GATK
 143 and SAM Tools were used for further analysis. Variants were annotated using annotation
 144 data from TubercuList [32].

145 2.5. Genotypic drug resistance prediction from WGS

146 TB profiler was used to identify mutations known to cause drug resistance [33].

147 2.6 Ethical aspects

148 IRB approval was got under the protocol number: 17471/2014 at Clinics Hospital of
 149 Ribeirão Preto Medical School-Brazil and 259/CNBS/14 at Bioethics National Committee
 150 for Health of Mozambique.

151 3. Results

152 3.1 Patients' demographic characteristics

153 A total of 17 patients from São Paulo State (Southeastern Brazil) were included in
 154 the study. Males were 88.2% (15) in this group. Pulmonary disease was present in 16
 155 (94.1%), and TB/HIV co-infection was not detected in these patients. There was a woman
 156 (case #2370) who was born in Angola (Africa) and was living in Brazil for five years when
 157 she was diagnosed with extensively drug-resistant TB (XDR-TB). Among 13 patients from
 158 Beira Hospital, located at Sofala province (Central Mozambique), there was seven (53.8%)

male. All the cases (100%) presented with pulmonary disease and 46.1% (6) were co-infected with TB/HIV.

3.2 Drugs susceptibility tests results

For all sequenced isolates over 99% of the reference genome was covered by at least one read and an average depth of coverage of 44 (min. 20 - max. 80) was achieved when considering the average depth of coverage for each isolate aligned to *M. tuberculosis* H37Rv with BWA, Novoalign and SMALT.

All the genotypic DST performed well when compared to the reference phenotypic DST, and WGS showed the best performance. WGS sensitivity and specificity for detecting mutations associated with resistance were respectively: 87.5% and 92.3% for rifampicin; 95.6% and 100% for isoniazid; 85.7% and 93.3% for streptomycin; 100% and 77.2% for ethambutol. The overall concordance of WGS with phenotypic DST was 89.6% for rifampicin and streptomycin; 96.5% for isoniazid and 82.7% for ethambutol (Figure 1).

The Xpert-MTB/RIF and Genotype MTBDRplus were not able to detect the mutation Val170Phe present in two isolates from Mozambique (#751 and #2078) and this had impact on the sensitivity of these two commercial tests.

Overall, Genotype-MTBDRplus sensitivity was better than Xpert-MTBDR/RIF for rifampicin (82.3% versus 75%). When compared to WGS the two commercial tests showed the same sensitivity (87.5%). Detection of isoniazid resistance was lower in Genotype-MTBDRplus compared with WGS (88% versus 95.6%). Detailed results of DST including WGS of Mozambique isolates are presented in table 1 and the Brazil isolates in table 2.

The 2x2 table comparing phenotypic DST with Genotype MTBDRplus, Xpert-MTB/RIF and WGS is shown in Figure 2.

3.3 Analysis of mutations associated with drug resistance detected by WGS

The most frequent detected mutation related to rifampicin resistance was *rpoB* Ser450Leu among Brazilian isolates, while *rpoB* Ser450Leu and *rpoB* His445Tyr were the most common mutations among Mozambican isolates.

The *katG* mutation Ser315Thr related to isoniazid resistance was the most frequent in Brazil and Mozambique. An intragenic *rrs* mutation was the most common mutation associated with streptomycin resistance among Brazilian isolates while the *rpsL* Lys43Arg

190 was the most frequent mutation among Mozambican isolates. Among all isolates, the most
191 common mutations related to fluoroquinolones resistance was *gyrA* Ala90Val.

192 The most frequent mutations related to ethambutol resistance were *embB*
193 Met306Val, *embB* Met306Ile among Brazilian isolates and *embB* Gln497Arg among
194 Mozambican isolates. The *pncA* Ala3Pro was the most frequent mutation among Brazilian
195 isolates, while *pncA* Lys96Arg and Lys19Arg were the most common among Mozambican
196 isolates.

197 In Figure 3 there is the complete information regarding the phenotypic DST, WGS
198 and the commercial DST for all the isolates from Brazil and Mozambique for rifampicin and
199 isoniazid resistance detection.

200 4. Discussion

201 One of the most important clinical applications of WGS is the prediction of
202 phenotypic drug resistance. However, the confidence at which these predictions are made
203 is dependent on our knowledge of the association between phenotype and genotype [8].
204 Several studies have investigated the utility of WGS as a genetic DST [13,33,34]. The
205 accuracy of predicting resistance varies among different classes of drugs as well as
206 different drugs from the same class. This relates to whether the epidemiological cut-off
207 differs substantially from the critical concentration. *M. tuberculosis* strains with a minimum
208 inhibitory concentration very close to the critical concentration will flip flop between
209 resistant and susceptible, thereby impacting the predictive value of the mutation causing
210 resistance [8, 35, 36].

211 Coll, et al. [33] evaluated isolates from different countries to obtain data of sensitivity
212 and specificity of WGS in predicting drug resistance, also using phenotypic tests as a
213 reference. They found respectively, high sensitivity and specificity values for the first-line
214 drugs: 96.2% and 98.1% for rifampicin; 92.8% and 100% for isoniazid; 88.7% and 81.7%
215 for ethambutol; 87.1% and 89.7% for streptomycin.

216 Similarly, Walker et al. [13] evaluated the same data including isolates from different
217 countries. The sensitivity and specificity values were respectively: 91.7% and 99.2% for
218 rifampicin; 85.2% and 98.4% for isoniazid; 82.3% and 95.1% for ethambutol; 81.6% and
219 99.1% for streptomycin. These results were further supported by Chatterjee et al. [34], who
220 evaluated isolates from India. The sensitivity for predicting resistance to rifampicin and
221 isoniazid was 100%, while the specificity was 94%. For ethambutol, sensitivity was 100%
222 and the specificity around 78%. For streptomycin, sensitivity was 85% and specificity

223 100%. Our data, as presented by others, reinforce the potential for WGS to be used as a
224 standalone drug resistance.

225 There was a discrepancy between phenotypic DST and WGS for rifampicin
226 resistance. In two isolates phenotypic DST showed resistance without mutations detected
227 in WGS, and in one isolate the opposite was observed. This might be related the presence
228 of more than one strain in the same clinical sample.

229 The majority of isolates resistant to rifampicin presented mutations in a well-defined
230 region of 81 base pairs of the *rpoB* gene, called rifampicin-resistance-determining region
231 (RRDR), and the Ser450Leu is the most frequent mutation associated with resistance to
232 this drug [37,38]. Importantly, two isolates (#751 and #2078) from Mozambique had the
233 *rpoB* Val170Phe mutation. This mutation is located outside the RRDR, and is thus not
234 detected by commercial assays currently being rolled-out at global scale [39]. In this study
235 we did not identify the *rpoB* Ile491Phe mutation, which was described in up to 30% of
236 MDR-TB isolates in Swaziland [40].

237 The molecular basis for isoniazid resistance is more complex than that for
238 rifampicin. Usually, mutations in the *katG* gene cause high-level isoniazid resistance,
239 whereas those in *inhA* and *kasA* result in low-level resistance [41]. *katG* Ser315Thr was
240 the most common mutation causing isoniazid resistance in this study. In a previous study,
241 we showed that the frequency of *katG* mutations was higher in the Mozambique (89.4%)
242 compared to the Brazilian isolates (59.5%) [42].

243 The molecular mechanism of pyrazinamide resistance is largely associated with
244 mutations in the *pncA* gene. These resistance-causing mutations are distributed
245 throughout the gene, but not all mutations detected in this gene confer resistance. In this
246 study, we identified five different *pncA* mutations. All of these have been previously
247 reported to confer resistance [43-45]. However, the WHO guidelines suggest the use of
248 pyrazinamide irrespective of DST results given the challenge of phenotypic DST, because
249 the intracellular activity of pyrazinamide against intracellular pathogens and low confidence
250 on the phenotypic DST [14,46].

251 The main mutations associated with streptomycin resistance occur in the *rpsL* gene,
252 which confers moderate to high-level drug resistance. Mutations in the *rrs* gene are
253 generally associated with moderate levels of resistance [47-50]. Among eight isolates from
254 Mozambique with detected resistance to streptomycin in the phenotypic DST, seven
255 (87.5%) also had resistance to isoniazid, both detected by WGS. Among Brazil isolates it

256 was similar, with five out of six (83.3%) of the isolates with streptomycin resistance in the
257 phenotypic DST had also resistance to isoniazid, as reported previously [51]. This is
258 probably due to the extensive use of streptomycin when DR-TB was suspected in previous
259 decades.

260 Most mutations that have been already recognized as associated with resistance to
261 fluoroquinolones are located in a conserved region of the *gyrA* gene, in codons 90 and 94,
262 which are the most frequently mutated [52]. A previous study of our group reported that
263 43.7% of 16 DR-TB isolates from Mozambique showed resistance to fluoroquinolones
264 (100% with the mutation *gyrA* Ala90Val) [53].

265 As far as we know, this is the first study using WGS in DR *M. tuberculosis* isolates
266 in Mozambique. Our group had sequenced two isolates from a single patient who evolved
267 from a MDR-TB status to a pre-XDR profile during the treatment [54]. This study amplifies
268 the sample of clinical isolates, and we were able to show that WGS had an excellent
269 performance and should be considered to be used in high burden TB and DR-TB areas
270 around the world.

271 The main limitations of this study are the absence of phenotypic DST for
272 pyrazinamide and second-line drugs which precluded comparisons with WGS, and the low
273 number of tested isolates.

274 5. Conclusion

275 To investigate DR-TB in clinical practice we start with phenotypic DST for first-line
276 drugs and only if resistance is detected, injectable second-line drugs (iSLD) and
277 fluoroquinolones are tested. The same flow is followed for DR-TB investigation with
278 genotypic DST. If rifampicin resistance is detected with Xpert or Genotype MTBDRplus,
279 another genotypic DST for fluoroquinolones and iSLD susceptibility evaluation is required.
280 WGS offers all the information about drug resistance in a single test. In this study WGS
281 also detected Val170Phe *rpoB* mutation not covered by commercial genotypic DST, which
282 is the great differential for the diagnostic strategy.

283

284 **Acknowledgments:**

285 We want to thank to Professor Lee Harrison (University of Pittsburgh) for research support;
286 Margarida Passeri Nascimento (Mycobacteriology Lab at HC FMRP-USP) for technical
287 support; Center for Medical Genomics (CMG) at the Clinics Hospital of Ribeirão Preto
288 (FMRP-USP) for the technical and research support; and Brazilian National Program for
289 Tuberculosis Control (Denise Arakaki-Sanchez) for the support to perform Xpert-MTB/RIF
290 in these isolates.

291 **Funding information:**

292 This research had support of FAPESP, Grant number 15/13.333-3; FAEPA grant
293 2015/2017; Fogarty International Center HIV Research Training Program grant, National
294 Institutes of Health, to the University of Pittsburgh (D43TW009753).

295

296 **Competing interests:** none declared.

297

298

299

300

REFERENCES

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2017.
- [2] World Health Organization. The end TB strategy - global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014.
- [3] Chaisson RE, Harrington M. How research can help control tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(5):558-68.
- [4] Niemann S, Köser CU, Gagneux S, et al. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints. *PloS One*. 2009; 4(10):e7407.
- [5] Keshavjee S, Farmer PE. Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine. *N Engl J Med*. 2012; 367(10):931-6.
- [6] Nicolau I, Ling D, Tian L, Lienhardt C, Pai M. Research questions and priorities for tuberculosis: a survey of published systematic reviews and meta- analyses. *PloS One*. 2012; 7(7): e42479.
- [7] Lange C, Abubakar I, Alffenaar JW, et al. Management of patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J*. 2014;44(1):23-63.
- [8] Domínguez J, Boettger EC, Cirillo D, et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016; 20(1):24-42.
- [9] Piersimoni C, Olivieri A, Benacchio L, Scarparo C. Current perspectives on drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex: the automated nonradiometric systems. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(1):20-8.
- [10] Barnard M, Albert H, Coetzee G, et al. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(7):787-92.
- [11] Hoshide M, Qian L, Rodrigues C, et al. Geographical differences associated with single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in nine gene targets among resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2014; 52(5):1322-9.

- 333 [12] Lin SY, Desmond EP. Molecular diagnosis of tuberculosis and drug resistance. Clin
334 Lab Med. 2014; 34(2): 297-314.
- 335 [13] Walker TM, Kohl TA, Omar SV, et al. Whole-genome sequencing for prediction of
336 Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort
337 study. Lancet Infect Dis. 2015; 15(10):1193-202.
- 338 [14] Witney AA, Gould KA, Arnold A, et al. Clinical application of whole-genome
339 sequencing to inform treatment for multidrug-resistant tuberculosis cases. J Clin Microbiol.
340 2015; 53(5):1473-83.
- 341 [15] Pankhurst LJ, Del Ojo Elias C, Votintseva AA, et al. Rapid, comprehensive, and
342 affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study.
343 Lancet Respir Med. 2016; 4(1):49-58.
- 344 [16] Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010;
345 11(1):31-46.
- 346 [17] Papaventsis D, Casali N, Kontsevaya I, et al. Whole genome sequencing of
347 Mycobacterium tuberculosis for detection of drug resistance: a systematic review. Clin
348 Microbiol Infect. 2017; 23(2):61-68.
- 349 [18] Feuerriegel S, Köser CU, Niemann S. Phylogenetic polymorphisms in antibiotic
350 resistance genes of the Mycobacterium tuberculosis complex. J Antimicrob Chemother.
351 2014; 69(5):1205-10.
- 352 [19] Becton, Dickinson and Company. BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit for the
353 antimycobacterial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis.
354 <http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-960sire.pdf>. Accessed November 3, 2017.
- 355 [20] HAIN LIFESCIENCE. Genotype MTBDRplus ver 2.0. Instructions for use 2012.
356 https://www.ghdonline.org/uploads/MTBDRplusV2_0212_304A-02-02.pdf. Accessed
357 November 3, 2017.
- 358 [21] World Health Organization. Molecular line probe assays for rapid screening of patients
359 at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB). Geneva, Switzerland: World Health
360 Organization, 2008.
- 361 [22] HainLifescience. Genotype MTBDRsl ver 2.0. Instructions for use 2015.
362 https://www.immunodiagnostic.fi/wp-content/uploads/MTBDRsl-V2_kit-insert.pdf. Accessed
363 November 3, 2017.

- 364 [23] World Health Organization. Xpert MTB/RIF implementation manual. Technical and
365 operational 'how-to': practical considerations. Geneva, Switzerland: World Health
366 Organization, 2014.
- 367 [24] Larsen MH, Biermann K, Tandberg S, et al. Genetic manipulation of *Mycobacterium*
368 *tuberculosis*. *Curr Protoc Microbiol*. 2007; Chapter 10: Unit 10 A.2.
- 369 [25] Illumina. Nextera® DNA library prep reference guide.
370 [https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/nextera_dna_kit/documentation.h](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/nextera_dna_kit/documentation.html)
371 [tml](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/nextera_dna_kit/documentation.html). Accessed November 3, 2017.
- 372 [26] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler
373 transform. *Bioinformatics*. 2009; 25 (14):1754–60.
- 374 [27] Dippenaar A, Parsons SDC, Miller MA, et al. Progenitor strain introduction of
375 *Mycobacterium bovis* at the wildlife-livestock interface can lead to clonal expansion of the
376 disease in a single ecosystem. *Infect Genet Evol*. 2017; 51: 235-238.
- 377 [28] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina
378 sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30 (15):2114–20.
- 379 [29] Ponstingl H, Ning Z. SMALT - A new mapper for DNA sequencing reads. 2010; F1000
380 Posters 1.
- 381 [30] McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The genome analysis toolkit: a Map Reduce
382 framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010; 20
383 (9):1297-303.
- 384 [31] Winglee K, Manson McGuire A, Maiga M, et al. Whole Genome Sequencing of
385 *Mycobacterium africanum* strains from Mali provides insights into the mechanisms of
386 geographic restriction. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10 (1): e0004332.
- 387 [32] Lew JM, Kapopoulou A, Jone LM, Cole ST. TubercuList – 10 years after.
388 *Tuberculosis*. 2011; 91 (1): 1-7.
- 389 [33] Coll F, McNerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug
390 resistance from whole-genome sequences. *Genome Med*. 2015; 7(1):51.
- 391 [34] Chatterjee A, Nilgiriwala K, Saranath D, et al. Whole genome sequencing of clinical
392 strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Mumbai, India: a potential tool for determining
393 drug-resistance and strain lineage. *Tuberculosis (Edinb)*. 2017; 107:63-72.
- 394 [35] Hillemann D, Hoffner S, Cirillo D, et al. First evaluation after implementation of a
395 quality control system for the second line drug susceptibility testing of *Mycobacterium*

- 396 tuberculosis joint efforts in low and high incidence countries. PLoS One. 2013; 8 (10):
397 e76765.
- 398 [36] Witney AA, Cosgrove CA, Arnold A, et al. Clinical use of whole genome sequencing
399 for Mycobacterium tuberculosis. BMC Med. 2016; 14:46.
- 400 [37] Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance
401 in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tuber Lung Dis. 1998; 79 (1):3-29.
- 402 [38] Brossier F, Sougakoff W, Aubry A, et al. Molecular detection methods of resistance to
403 antituberculosis drugs in Mycobacterium tuberculosis. Med Mal Infect. 2017; 47(5): 340-
404 348.
- 405 [39] Andre E, Goeminne L, Cabibbe A, et al. Consensus numbering system for the
406 rifampicin resistance-associated rpoB gene mutations in pathogenic mycobacteria. Clin
407 Microbiol Infect. 2017; 23 (3):167-172.
- 408 [40] Andre E, Goeminne L, Colmant A, et al. Novel rapid PCR for the detection of
409 Ile491Phe rpoB mutation of Mycobacterium tuberculosis, a rifampicin-resistance-conferring
410 mutation undetected by commercial assays. Clin Microbiol Infect. 2017; 23 (4): 267.e5-
411 267.e7.
- 412 [41] Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, Selvakumar N. Overview on mechanisms of
413 isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis. Infect Genet Evol. 2016;
414 45: 474-492.
- 415 [42] Bollela VR, Namburete EI, Feliciano CS, et al. Detection of katG and inhA mutations
416 to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis. Int J Tuberc Lung
417 Dis. 2016; 20(8):1099-104.
- 418 [43] Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, et al. Phenotypic characterization of pncA
419 mutants of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(9):2291-
420 5.
- 421 [44] Nusrath Unissa A, Hanna LE. Molecular mechanisms of action, resistance, detection
422 to the first-line anti tuberculosis drugs: rifampicin and pyrazinamide in the post whole
423 genome sequencing era. Tuberculosis (Edinb). 2017; 105: 96-107.
- 424 [45] Chang KC, Yew WW, Zhang Y. Pyrazinamide susceptibility testing in Mycobacterium
425 tuberculosis: a systematic review with meta-analyses. Antimicrob Agents Chemother.
426 2011; 55 (10): 4499-505.
- 427 [46] World Health Organization. WHO treatment guidelines for drug resistant tuberculosis -
428 2016 update. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2016.

- 429 [47] Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and
430 mol
431 ecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(2):267-74.
- 432 [48] Tudó G, Rey E, Borrell S, et al. Characterization of mutations in streptomycin-resistant
433 *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. *J Antimicrob*
434 *Chemother*. 2010; 65 (11): 2341-6.
- 435 [49] Jagielski T, Ignatowska H, Bakula Z, et al. Screening for streptomycin resistance-
436 conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *PLoS*
437 *One*. 2014; 9(6):e100078.
- 438 [50] Wong SY, Lee JS, Kwak HK, et al. Mutations in *gidB* confer low-level streptomycin
439 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(6):
440 2515-22.
- 441 [51] Scardigli A, Caminero J A. Management of drug-resistant tuberculosis. *Curr Respir*
442 *Care Rep*. 2013; 2: 208–217.
- 443 [52] Sun Z, Zhang J, Zhang X, et al. Comparison of *gyrA* gene mutations between
444 laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical
445 isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31(2):115-21.
- 446 [53] Namburete EI, Tivane I, Lisboa M, et al. Drug-resistant tuberculosis in Central
447 Mozambique: the role of a rapid genotypic susceptibility testing. *BMC Infect Dis*. 2016;
448 16:423.
- 449 [54] Silva Feliciano C, Rodrigues Praça J, Peronni K, et al. Evaluation of resistance
450 acquisition during tuberculosis treatment using whole genome sequencing. *Braz J Infect*
451 *Dis*. 2016; 20(3):290-3.

Tables

Table 1- Resistance profile and mutations evidenced by susceptibility tests and WGS of isolates from Mozambique

MZB Isolate ID	MTB06 plus		MTB06 d		Xpert			Phenotypic test			Whole genome sequencing						
	Mut R	Mut H	Mut Fq	Mut ISL	R	H	E	Sm	Mut R	Mut H	Mut Z	Mut E	Mut Sm	Mut ISL	Mut Fq	Mut PAS	
227	S331L	WT, S315T2 (Mut G)			Yes	Yes	No	No	rpoB Ser430Glu	KatG Ser315Thr	emkC Thr770Leu, emkE Gln378Glu						
243	WTB, WT5	WT2 (p6A)			No	No	No	No									
751		WT, S315T2 (Mut G)			No	Yes	Yes	Yes	rpoB Val179Phe	KatG Ser315Thr	proA Lys94Arg	emkE Met300Val	rpoB Lys434Tyr				
894		WT, S315T2 (Mut G)			No	Yes	No	Yes		KatG Ser315Thr			rpoB Lys434Tyr				
964	WT7, H250				Yes	No	No	No	rpoB His443Tyr								
2075					No	Yes	No	Yes		KatG Ser315Thr			rpoB Lys434Tyr				
2078		WT, S315T2 (Mut G)			No	Yes	Yes	Yes	rpoB Val179Phe	KatG Ser315Thr	proA Lys94Arg	emkE Met300Val	rpoB Lys434Tyr				
2268	WTB, S331L	WT, S315T2 (Mut G), WT1, TSC (p6A)	WT2, A30V (Leu A)	WT2, C14T (Glu)	Yes	NV	NV	NV	rpoB Ser430Glu	KatG Ser315Thr	proA Arg134Gly	emkE Met300Glu			DTA, Abi300Val		
2721	WT7	WT, S315T2 (Mut G)	WT2, A30V (Leu A)		Yes	Yes	Yes	Yes	rpoB His443Tyr	KatG Ser315Thr	proA Leu194Arg	emkE Gln497Arg	rpoB Lys434Tyr		DTA, Abi300Val		
2937					No	Yes	No	No		KatA Gln497Phe		emkE Met300Glu	rpoB Lys434Tyr				
3033	S331L	WT, S315T2 (Mut G)			Yes	Yes	Yes	Yes	rpoB Ser430Glu	KatG Ser315Thr		emkE Gln497Arg	rpoB Lys434Tyr				
3150					No	No	No	Yes				emkC Thr770Leu, emkE Gln378Glu					
3185	WT7	WT, S315T2 (Mut G)	WT2, A30V (Leu A)		Yes	Yes	Yes	Yes	rpoB His443Tyr	KatG Ser315Thr	proA Leu194Arg	emkE Gln497Arg	rpoB Lys434Tyr		DTA, Abi300Val		

Mut R: mutations in rpoB gene related to rifampicin resistance; Mut H: mutations related to isoniazid resistance; Mut Fq: mutations related to fluoroquinolones resistance; Mut ISL: mutations related to injectable second line drugs resistance; WT: absence of wild type band; Xpert R: rifampicin resistance detected by Xpert MTB/RIF; R: rifampicin; H: isoniazid; E: ethambutol; Sm: streptomycin; Z: pyrazinamide; PAS: para-aminosalicylic acid; NV: not valid phenotypic test

Table 2- Resistance profile and mutations evidenced by susceptibility tests and WGS of isolates from Brazil

BBA Isolate ID	MTBDRplus Mut R	MTBDRplus Mut H	MTBDRplus Mut Fq	MTBDRplus Mut SLD	Xpert R	Phenotypic test				Whole genome sequencing						
						R	H	E	Sm	Mut R	Mut H	Mut Z	Mut E	Mut Sm	Mut SLD	Mut PAS
241	WT, S315T1 (kat G)				No	No	Yes	No	No	Kat5 Ser315Thr, KatA Gly289Ser						
535	WTB, S331L				No	Yes	Yes	No	No							
868	WTB, S331L		WT3, AKOV (Eyr A)		Yes	Yes	Yes	No	No	rrpB Ser450Leu						gpa Ala300Val
1028	WT, S315T1 (kat G)				No	No	Yes	No	No	Kat5 Ser315Thr						
1245	WT7	WT, S315T1 (kat G), WT (rrp B)			Yes	Yes	Yes	No	No	rrpB His442Leu	Kat5 Ser315Thr					
1662	WTB, S331L	WT, S315T1 (kat G)			Yes	Yes	Yes	No	Yes	rrpB Ser450Leu	Kat5 Ser315Thr, pncA Ala390	embB Met300Val	rrpL Lys43Arg			
1696	WT3				Yes	No	No	No	No							
1804	WT, S315T1 (kat G)				No	No	Yes	No	No	Kat5 Ser315Thr, KatA Gly289Ser						
1874	WT, C15T (rrp A)	WT, S315T1 (kat G)			No	No	Yes	No	Yes	rrpA C15T						
2080	WT, S315T1 (kat G)				No	No	Yes	No	Yes	Kat5 Ser315Thr				rrpL Lys43Arg		
2370	WTB, S331L	WT, S315T1 (kat G)	WT1, UNQ4VY (Eyr A)	WT1, AL401G (rrp)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	rrpB Ser450Leu	Kat5 Ser315Thr	pncA Ser314Arg	embB Met300Leu	rrpL Lys43Arg, rrpL Lys43Arg	gpa Ala300Val	lysB Arg48Gln
2391	WTB, S331L	WT, S315T1 (kat G)			Yes	Yes	Yes	No	No	rrpB Ser450Leu	Kat5 Ser315Thr, KatA Gly289Ser	pncA Arg149Gln, pncA Phe149Val				
2782	WT2	WT, C15T (rrp A)			Yes	No	Yes	No	No							
2943	WT3				Yes	No	No	No	Yes	rrpB Ser450Leu	Kat5 Ser315Thr			rrpL Lys43Arg		
3052	S331L	WT, S315T1 (kat G)			Yes	Yes	Yes	No	No							
3090	WTB, S331L	WT, S315T1 (kat G)	WT3, AKOV, D146S, E194VY (Eyr A)		Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	rrpB Ser450Leu	Kat5 Ser315Thr	pncA Ala390	embB Met300Val	rrpL Lys43Arg	gpa Ala300Val	lysB Arg48Gln
3360	S331L	WT, S315T1 (kat G)			No	Yes	Yes	No	No		Kat5 Ser315Thr, KatA Gly289Ser		embB Met300Leu			

Mut R: mutations in rpoB gene related to rifampicin resistance; Mut H: mutations related to isoniazid resistance; Mut Fq: mutations related to fluoroquinolones resistance; Mut SLD: mutations related to injectable second line drugs resistance; WT: absence of wild type band; Xpert R: rifampicin resistance detected by Xpert MTB/RIF; R: rifampicin; H: isoniazid; E: ethambutol; Sm: streptomycin; Z: pyrazinamide; PAS: para-aminosalicylic acid

Figure legends

Figure 1- Heat-map of the resistance profile comparing the phenotypic and WGS DST results. Red color indicates drug resistance and green color indicates drug sensitivity.

H: isoniazid; R: rifampicin; E: ethambutol; Sm: streptomycin; NV: not valid phenotypic test. Br: isolates from Brazil, MZB: isolates from Mozambique.

Figure 2 - The sensitivity, specificity and concordance between phenotypic DST and WGS (A); phenotypic DST and Genotype MTBDRplus (B); phenotypic DST and Xpert-MTB/RIF (C).

RR: rifampicin resistance; HR: isoniazid resistance; WGS: whole genome sequencing

Figure 3- Phenotypic and commercial genotypic drug-susceptibility tests (DST) analyzed together with WGS results for rifampicin resistance in Brazil (A) and Mozambique (B) isolates; and for isoniazid resistance in Brazil (C) and Mozambique (D) isolates.

Isolate ID	Phenotypic DST				Genotypic (WGS) DST			
	H	R	E	Sm	H	R	E	Sm
Br 241								
Br 536								
Br 868								
Br 1028								
Br 1245								
Br 1662								
Br 1696								
Br 1804								
Br 1874								
Br 2080								
Br 2370								
Br 2591								
Br 2782								
Br 2943								
Br 3052								
Br 3200								
Br 3360								

Isolate ID	Phenotypic DST				Genotypic (WGS) DST			
	H	R	E	Sm	H	R	E	Sm
MZB 227								
MZB 243								
MZB 751								
MZB 894								
MZB 964								
MZB 2075								
MZB 2078								
MZB 2368								
MZB 2721								
MZB 2937								
MZB 3033								
MZB 3150								
MZB 3185								

	Resistant isolate
	Susceptible isolate

A

Rifampicin resistance (RR) in Phenotypic DST

	Yes	No
RR in WGS	14	15
	2	14
	16	29

Sensitivity= 87.5%
 Specificity = 92.3%
 Concordance= 89.7%

Isoniazid resistance (HR) in Phenotypic DST

	Yes	No
HR in WGS	22	22
	1	7
	23	29

Sensitivity= 95.6%
 Specificity = 100%
 Concordance= 96.5%

B

Rifampicin resistance (RR) in Phenotypic DST

	Yes	No
RR in Genotype MTBDRplus	14	18
	3	11
	17	29

Sensitivity= 82.3%
 Specificity = 66.7
 Concordance= 75.8%

Isoniazid resistance (HR) in Phenotypic DST

	Yes	No
HR in Genotype MTBDRplus	22	23
	3	6
	25	29

Sensitivity= 88%
 Specificity = 75%
 Concordance= 86.2%

C

Rifampicin resistance (RR) in Phenotypic DST

	Yes	No
RR in Xpert MTB/RIF	12	15
	4	14
	16	29

Sensitivity= 75%
 Specificity = 76.9%
 Concordance= 75.8%

A

<i>rpoB</i>	Brazil isolates													
	536	868	1245	1662	1696	2370	2591	2782	2943	3052	3200	3360		
Mutations	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G
Rifampicin	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ser431Thr														
His445Leu														
Ser450Leu														

B

<i>rpoB</i>	Mozambique isolates													
	227	243	751	964	2078	2368	2721	3033	3185					
Mutations	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G	X	P	G
Rifampicin	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Val170Phe														
His445Tyr														
Ser450Leu														

C

katG/ kasA	Brazil isolates													
	241	536	1028	1245	1662	1804	1874	2080	2370	2591	2782	3052	3200	3360
Mutations	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G
Isoniazid	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
katG Ser315Thr														
kasA Gly269Ser														
inhA C15T														

D

katG/ kasA	Mozambique isolates													
	227	243	751	894	2075	2078	2368	2721	2937	3033	3185			
Mutations	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G
Isoniazid	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
katG Ser315Thr														
kasA Gly269Ser														

Phenotypic resistance detected

Genotype MTBD Rplus resistance detected

Xpert RIFB resistance detected

WGS mutation detected

No resistance detected

not valid phenotypic DST

Anexos

ANEXO A

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 03 de fevereiro de 2015

Ofício nº 410/2015
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO GENÔMICO TOTAL"**, foi analisado "AD REFERENDUM" pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 17471/2014.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

CINARA SILVA FELICIANO

PROF.DR. VALDES ROBERTO BOLLELA(Orientador)

Depto. de Clínica Médica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14049-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733, IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO B

Aprovação pelo Comitê Nacional de Bioética para Saúde de Moçambique

REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE
COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exma Senhora
Dr^a Evangelina Inácio Namburete
UCM

Ref: 359/CNBS/14

Data 03 de Novembro de 2014

Assunto: Parecer do Comité Nacional de Bioética para saúde (CNBS) sobre o estudo: "*Perfil de Sensibilidade das Cepas de Mycobacterium tuberculosis isolados em pacientes com tuberculose (TB) e co-infecção TB-HIV em Sofala, Moçambique*"

O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) fez a avaliação das correcções efectuadas no protocolo intitulado: "*Perfil de Sensibilidade das Cepas de Mycobacterium tuberculosis isolados em pacientes com tuberculose (TB) e co-infecção TB-HIV em Sofala, Moçambique*"

Registado no CNBS com o número 82/CNBS/2014, conforme os requisitos da Declaração de Helsínquia,

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo, o CNBS dá a sua devida aprovação aos seguintes documentos:

- Protocolo (versão final) de 2014
- Instrumento de recolha de dados (versão final) de 2014
- Consentimento Informado (versão final) de 2014

Todavia, o CNBS informa que:

- 1- A presente aprovação não substitui a autorização administrativa.
- 2- Não houve declaração de conflitos de interesse por nenhum dos membros do CNBS.
- 3- A aprovação terá a validade de um ano, terminando esta a 03 de Novembro de 2015. Os investigadores deverão submeter o pedido de renovação da aprovação um mês antes de terminar o prazo.
- 4- Recomenda-se aos investigadores que mantenham o CNBS informado do decurso do estudo.
- 5- A lista actualizada dos membros do CNBS esta disponível na secretaria do Comité.

Com as nossas mais cordiais saudações.

O Presidente

Dr. João Fernando Lima Schwalbach

ENDEREÇO:
MINISTÉRIO DA SAÚDE
C. POSTAL 264
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende
MAPUTO - MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)
Telex: 6-239 MISAU MO
FAX: 258 (1) 426547
258 (1) 33320