

Tuberculose resistente: revisão molecular

Resistant tuberculosis: a molecular review

Maria Lúcia Rosa Rossetti^a, Andréia Rosane de Moura Valim^b, Márcia Susana Nunes Silva^a e Vívian Sumnienski Rodrigues^b

^aFundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde/Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. ^bUniversidade Federal do Rio Grande do Sul / Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil

Descritores

Tuberculose, prevenção. Tuberculose, quimioterapia. Antituberculosos, farmacocinética. Tuberculose resistente a múltiplas drogas. *Mycobacterium tuberculosis*, efeito drogas. Resistência a múltiplas drogas. Isoniazida, farmacocinética. Rifampina, farmacocinética. Pirazinamida, farmacocinética. Etambutol, farmacocinética. Streptomycina, farmacocinética.

Keywords

Tuberculosis, prevention & control. Tuberculosis, drug therapy. Antitubercular agents, pharmacokinetics. Tuberculosis, multidrug-resistant. Mycobacterium tuberculosis, drug effects. Drug resistance, multiple. Isoniazid, pharmacokinetics. Rifampin, pharmacokinetics. Pyrazinamide, pharmacokinetics. Ethambutol, pharmacokinetics. Streptomycin, pharmacokinetics.

Resumo

O progresso na compreensão dos mecanismos de resistência aos fármacos usados no tratamento da tuberculose tem permitido o desenvolvimento de novos métodos para a detecção da tuberculose resistente. A resistente aos fármacos representa uma ameaça para os programas de controle da tuberculose. Para tanto, é necessário conhecer o padrão de sensibilidade das linhagens para fornecer o tratamento adequado. Os estudos moleculares dos mecanismos de ação dos fármacos antituberculose têm elucidado as bases genéticas da resistência aos fármacos em *Mycobacterium tuberculosis*. Os mecanismos de resistência aos fármacos na tuberculose são causados por mutações cromossomais em diferentes genes da bactéria. Durante a exposição aos fármacos, há uma pressão seletiva favorecendo o desenvolvimento de linhagens resistentes. A tuberculose multirresistente é um problema nacional e internacional que traz sérias dificuldades para o controle global da doença. Realizou-se uma revisão sobre os mecanismos moleculares associados à resistência aos fármacos com ênfase nas novas perspectivas para detectar os isolados resistentes.

Abstract

*Progress to understanding the basis of resistance to antituberculous drugs has allowed molecular tests for detection of drug-resistant tuberculosis to be developed. Drug-resistant tuberculosis poses a threat to tuberculosis control programs. It is necessary thus to know drug susceptibilities of individual patient's strain to provide the appropriate drug combinations. Molecular studies on the mechanism of action of antituberculous drugs have elucidated the genetic basis of drug resistance in *M. tuberculosis*. The mechanisms of drug resistance in tuberculosis are a result of chromosomal mutations in different genes of the bacteria. Upon drug exposure there is a selective pressure for such resistant mutants. Multidrug-resistant tuberculosis is a health problem of increasing significance for the whole global community. This paper reviews the molecular mechanisms associated with drug-resistance as well the new perspectives for detecting resistant isolates.*

INTRODUÇÃO

Conhecida há milhares de anos, a tuberculose (TB) é uma das doenças infecciosas que mais mortes tem causado em todo o mundo, ocasionando anualmente mais de 2 milhões de óbitos e 8 milhões de novos casos.¹⁰ Causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, essa doença apresenta um sério impacto no País, apresentando a estimativa anual de 129.000 novos casos. Entretanto, a rede de serviços de saúde notifica apenas 80 mil a 90 mil casos clínicos.²⁵ O Brasil apresenta o mais elevado número de casos da América Latina (53,4 novos casos/100.000 habitantes), sendo o sexto país do mundo com maior incidência de TB.⁴³

A estratégia de controle da TB tem sido elaborada por programas governamentais. Eles consistem, basicamente, em diagnosticar e tratar os casos de TB o mais rapidamente possível, a fim de interromper a transmissão e evitar a difusão da doença. O tratamento da TB consiste em uma associação de fármacos, geralmente isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e pirazinamida (PZA), durante dois meses, seguida por quatro meses com INH e RMP. Situações como monoterapia, prescrição imprópria dessa associação ou falta de colaboração do paciente para o uso desse esquema terapêutico podem levar ao surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos (multirresistência, MDR).

O aumento do número de linhagens MDR (resistentes a, pelo menos, rifampicina e isoniazida) tem causado enorme preocupação, pois contribui para aumentar a proporção de mortes por TB, estando frequentemente associada à infecção pelo HIV.³¹

A presença de linhagens MDR reflete deficiências no controle da TB, o que dificulta o tratamento e a prevenção da doença, causando sua difusão. É necessário conhecer a suscetibilidade aos diferentes fármacos de uma linhagem individual a fim de se iniciar um tratamento com a combinação de fármacos mais adequada.

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de resistência auxilia no desenvolvimento de metodologias para a detecção mais rápida dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes. Isto auxiliará na redução de linhagens resistentes circulantes, trazendo grandes benefícios para a saúde pública.

Devido à relevância do tema, o objetivo deste manuscrito foi realizar uma revisão bibliográfica, buscando compilar as informações sobre os mecanismos

moleculares envolvidos com a resistência aos fármacos apresentada pelo *M. tuberculosis*. Procurou-se discutir a aplicabilidade desses novos conhecimentos, suas limitações e a utilização na rotina clínica.

Os artigos utilizados no estudo foram publicados em revistas científicas indexadas nos últimos dez anos, porém, foram enfatizadas as pesquisas mais recentes. As bases de dados utilizadas na revisão bibliográfica foram *Medline* e *PubMed*.

Métodos convencionais de diagnóstico de TB resistente

Os testes de sensibilidade aos fármacos utilizados no tratamento requerem o isolamento do *M. tuberculosis* do espécime clínico em um meio de cultura adequado, como Löwenstein-Jensen e Ogawa. Essa etapa de isolamento do bacilo é bastante lenta (três a seis semanas). Vários métodos podem ser utilizados para testar a sensibilidade do *M. tuberculosis*, sendo o das proporções o mais empregado.²⁴ Os resultados desse método são reportados como a porcentagem do total da população bacteriana resistente a um determinado fármaco. Isto é definido pela quantidade do crescimento no meio de cultura contendo o fármaco quando comparado ao crescimento em meio sem o fármaco.

O teste de sensibilidade para isolados de *M. tuberculosis* também pode ser realizado por técnicas radiométricas como o sistema BACTEC™. Esse método pode reduzir o tempo de identificação dos microorganismos resistentes aos fármacos para três semanas.

O teste de sensibilidade é recomendado para pacientes com baciloscopia positiva que não se torna negativa após três meses de tratamento, para pacientes com baciloscopia negativa que volta a ser positiva durante o tratamento para TB e para aqueles tratados previamente para TB, isto é, nos casos de recidivas. São candidatos também ao teste os pacientes com HIV positivo/Aids e tuberculose, pacientes com TB e por manterem contato com pacientes com suspeita de TB resistente ou TB resistente confirmada.

As bases moleculares dos mecanismos de resistência

As micobactérias são caracterizadas por um envelope celular altamente hidrofílico que atua como uma barreira de permeabilidade para muitos componentes⁸ e possui um sistema de efluxo de fármacos bem desenvolvido.⁵ A micobactéria também produz enzimas hidrolíticas ou fármaco-modificadoras como

β -lactamases, aminoglicosídeo acetil transferases. Estes estão entre os fatores citados para explicar a resistência natural de muitas espécies de micobactérias aos antibióticos usados frequentemente. Entretanto, existe um arsenal terapêutico limitado usado para tratar a TB, conforme já citado. O tratamento adequado dos pacientes com combinações desses agentes durante períodos prolongados (seis a nove meses) leva a cura de 95% dos casos de TB.³⁶

Análises genéticas e moleculares de bacilos resistentes sugerem que a resistência é usualmente adquirida por alterações no alvo do fármaco como consequência de mutações no gene que codifica esse alvo (Tabela). Durante a exposição do *M. tuberculosis* ao fármaco, existe uma pressão seletiva para mutantes resistentes. As linhagens MDR surgem após uma sequência de mutações nos diferentes genes envolvidos com cada um dos fármacos.⁴⁵

Os avanços em biologia molecular tornaram possível investigar os mecanismos genéticos da resistência aos fármacos, bem como caracterizar as mutações relacionadas à resistência aos diversos fármacos. Entretanto, ainda há mecanismos bem mais complexos a ser esclarecidos, como a resistência à isoniazida.

RESISTÊNCIA À ISONIAZIDA

A isoniazida ou hidrazida do ácido isonicotínico (INH) é o mais antigo fármaco sintético efetivo contra a TB e um dos principais quimioterápicos de primeira linha no tratamento da doença, sendo reconhecida, já em 1952, como potente agente contra o *M. tuberculosis*.²³ A concentração inibitória mínima (MIC) é muito baixa, o que contribui para sua eficácia (0,02-0,05 μ g/ml).

O mecanismo de ação da INH, assim como o que confere resistência, é complexo e ainda pouco entendido. Evidências sugerem que esse fármaco inibe a biossíntese dos ácidos micólicos que compõem a

parede celular, tornando a bactéria suscetível aos radicais de oxigênio e a outros fatores do meio.

A resistência para INH (INH^R) parece estar associada a uma variedade de mutações que afetam um ou mais genes (Tabela), como os que codificam para catalase-peroxidase (*katG*)⁴⁴ a enzima enoil-ACP redutase, envolvida na biossíntese do ácido micólico (*inhA*)², a alkyl hidroperóxido redutase, envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo (*ahpC*)⁴² e a enzima β -ketoacyl ACP syntase (*kasA*).²¹

A partir da análise de regiões do DNA de isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH, diversos pesquisadores têm relatado a ocorrência de mutações associadas a esse tipo de resistência, sendo que as mutações nos genes *katG* e *inhA* são encontradas em 75-85% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes a esse fármaco.³² Essas mutações frequentemente estão associadas à perda da atividade de catalase-peroxidase.^{9,11,27,40} Essa enzima é responsável também pela ativação da INH endogenamente.

A enzima *inhA* (enoil-ACP redutase), que catalisa uma etapa primária na síntese de ácido graxo, quando alterada em consequência da mutação no gene, modifica sua afinidade pelo cofator, resultando na expressão de um fenótipo resistente à INH.

As mutações em *ahpC* foram identificadas em isolados clínicos desse microorganismo e estão localizadas em importantes regiões promotoras do gene.^{8,29}

Uma pequena proporção de linhagens INH^R não apresenta mutações nos genes *katG*, *inhA* ou *ahpC*, indicando que outros genes estão envolvidos com a resistência à INH. A identificação de novos genes envolvidos no processo de resistência poderá auxiliar não apenas no entendimento de como atua a INH mas também facilitar o desenvolvimento de novos métodos moleculares para a detecção de microorganismos resistentes.

Tabela - Mecanismos de resistência aos fármacos em *Mycobacterium tuberculosis*.

Fármacos	Mecanismo de ação	Genes envolvidos com a resistência	Função	Frequência de mutações em <i>M. tuberculosis</i> resistentes (%)
Isoniazida	Inibição da biossíntese do ácido micólico	KatG	Conversão do pró-fármaco	42-58
		InhA	Alvo do fármaco	21-34
		KasA	Alvo do fármaco	Não estabelecido
Rifampicina	Inibição da transcrição	AhpC	Marcador de resistência	10-15
		RpoB	Alvo do fármaco	96-100
Pirazinamida	Inibição da síntese de ácidos graxos	PncA	Conversão do pró-fármaco	72-97
Etambutol	Inibição da síntese do arabinogalactan	FasA	Alvo do fármaco?	Não estabelecido
		EmbCAB	Alvo do fármaco	47-65
Estreptomicina	Inibição da síntese protéica	RpsL	Alvo do fármaco	52-59
		rrs (16S RNA)	Alvo do fármaco	8-21

Estudos realizados pelo Laboratório Central de Saúde Pública* em isolados de *M. tuberculosis* INH^R obtidos em diversas áreas geográficas do Brasil têm demonstrado que a maioria das mutações ocorre no gene *katG* (75%), seguida por mutações na região promotora de *ahpC* (14,6%). Apenas 1% dos isolados apresentou mutações no gene *inhA*. Também foi observado que 6,2% dos isolados apresentaram mutação nos genes *katG* e *ahpC* simultaneamente.

RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA

A rifampicina, derivado semi-sintético da rifamicina, é extremamente efetiva contra *M. tuberculosis*, com MIC de 0,1 µg/ml a 0,2 µg/ml, e possui uma atividade bactericida rápida, eliminando bactérias persistentes (ação esterilizante).³ A RMP liga-se à subunidade β da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB*, inibindo a etapa de transcrição.

A resistência à rifampicina (RMP^R) é pouco comum, porém tem aumentado ultimamente, alertando para o desenvolvimento de linhagens MDR. Dificilmente a resistência à RMP ocorre isolada. Na maioria dos casos, está associada a outros fármacos, principalmente ao INH. Nesse contexto, a resistência à RMP pode ser assumida como um marcador para a TB MDR.³⁹

A caracterização do gene *rpoB* em *Echerichia coli* demonstrou que a rifampicina interage especificamente com a subunidade β da RNA polimerase e que mutações no locus *rpoB* conferem trocas conformacionais, impedindo uma ligação eficiente do fármaco e, conseqüentemente, a resistência.^{16,41} Essas informações auxiliaram na compreensão das bases de resistência à RMP em *M. tuberculosis*.

Até o momento, foram realizados vários estudos para caracterizar as linhagens resistentes e sensíveis à RMP. Uma compilação dos dados disponíveis indicou que 96% dos *M. tuberculosis* resistentes ao fármaco, isolados de pacientes epidemiologicamente não-relacionados, apresentaram 35 mutações diferen-

tes localizadas em uma região central de 81 pares de base (pb) no gene *rpoB* (Figura 1).^{17,27,35}

No Brasil, Valim et al³⁸ (2000) investigaram mutações em 82 linhagens resistentes à RMP, isoladas de pacientes dos estados do Rio de Janeiro, de São Paulo e do Rio Grande do Sul. Os resultados desse estudo confirmaram que a maioria das mutações encontradas ocorreu na região já descrita; mutações novas também foram observadas.

RESISTÊNCIA À PIRAZINAMIDA

A pirazinamida (PZA) é um análogo estrutural da nicotinamida e tem sido usada no esquema primário de tratamento contra TB, juntamente com INH e RMP, nos últimos 50 anos. A adição desse fármaco no esquema de tratamento fez com que este fosse reduzido de nove para seis meses.³⁰

A PZA tem grande influência no ataque de bacilos semidormentes, visto que esse fármaco tem alta atividade em meios ácidos (pH= 5,5).^{7,14} Esses meios são característicos de focos inflamatórios de TB, em que geralmente se encontram esses bacilos. A atividade da PZA é altamente específica contra *M. tuberculosis*, apresentando pouco ou nenhum efeito em outras micobactérias, incluindo *M. bovis*, que demonstra um alto nível de resistência intrínseca ao fármaco.^{20,22}

Mais de 70% dos isolados de *M. tuberculosis* PZA resistentes (PZA^R) apresentaram mutações no gene *pncA*, que codifica a enzima pirazinamidase, a qual converte o fármaco PZA em sua forma ativa.³² Recentemente, Morlock et al²⁶ (2000) identificaram inúmeras mutações no gene *pncA* em linhagens de *M. tuberculosis*, que podem servir como um indicador de resistência à PZA. Várias mutações encontradas estão associadas a uma pirazinamidase ineficiente.^{30,34}

A ausência na correlação de mutações no gene

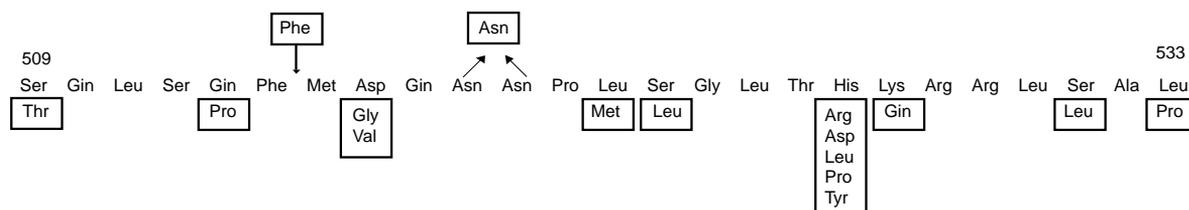


Figura 1 - Aminoácidos substituídos nos códons 509 a 533 da subunidade b da RNAP de *M. tuberculosis*. As posições dos aminoácidos substituídos devido as mutações de ponto são mostradas nas caixas abaixo da seqüência. As posições dos aminoácidos substituídos ou ausentes devido a inserções ou mutações são mostradas nas caixas acima da seqüência. Extraída de Willians et al⁴¹ (1994).

*Comunicação pessoal de Marcia S. Nunes Silva, da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, RS.

pncA de isolados de *M. tuberculosis* PZA^R indica a possibilidade de pelo menos um mecanismo adicional mediador de resistência à PZA. Mestdagh et al²² (1999) relatam a possibilidade de resistência à PZA ser adquirida a partir de mutações existentes no alvo do ácido pirazinóico na micobactéria.

RESISTÊNCIA AO ETAMBUTOL

O etambutol (EMB), denominado quimicamente de dextro-etilenodiiimino-di-1-butanol-dihidroclorido, é amplamente empregado no esquema primário de tratamento da TB, pois atua diretamente sobre a síntese de arabinose em *M. tuberculosis* e outras micobactérias.^{4,19} Seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da incorporação do ácido micólico, essencial para a formação da parede micobacteriana.³²

As bases genéticas para a resistência ao fármaco estão associadas a alterações no gene *embB* em 70% dos isolados EMB resistentes (EMB^R). Foram encontradas mutações em múltiplos códons que resultaram em dois, três ou quatro aminoácidos diferentes na proteína EmbB.²⁸

Para a total compreensão dos mecanismos utilizados pela micobactéria para aquisição de resistência ao EMB, ainda se faz necessária a identificação de outros locais ou mutações que podem ocorrer nesses organismos resistentes, possibilitando estudos bioquímicos e de variantes moleculares envolvidas nesse processo.

RESISTÊNCIA À ESTREPTOMICINA

A estreptomicina (SM) é um antibiótico aminociclitol glicosídico que inibe a tradução do RNA mensageiro (mRNA), afetando também a acurácia transducional.¹²

A resistência à SM em *M. tuberculosis* ocorre por mutações no alvo do fármaco, mais especificamente nos ribossomos. O principal sítio de mutação é o gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossomal S12,^{5,11,15,33} em que ocorrem mutações resultando na substituição de um único aminoácido. O mapeamento dessas mutações revela que estas ocorrem em regiões altamente conservadas do gene.

Um segundo mecanismo da resistência ocorre por alterações no gene que codifica o RNA 16S (*rrs*) em duas regiões diferentes.³ Há também um terceiro mecanismo de resistência que pode estar relacionado a trocas na entrada do fármaco para o interior da célula bacteriana.⁶

Métodos moleculares para a detecção de resistência

Atualmente, está sendo testada uma variedade de métodos moleculares que buscam a detecção rápida de isolados de bactérias sensíveis aos fármacos. Muitos desses métodos são baseados na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite amplificar especificamente apenas as regiões dos genes envolvidas na resistência para posterior detecção de mutações. A análise das seqüências de nucleotídeos para identificar a presença de mutações tem sido feita por metodologias que incluem o seqüenciamento de DNA, análises de fragmentos de DNA gerados com enzimas de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP), avaliação de polimorfismo conformacional de fragmentos de fita simples (*Single-Strand Conformation Polymorphism*, SSCP), entre outras.

O seqüenciamento de produtos de PCR (amplicons) é a principal técnica usada para elucidar os mecanismos de resistência aos fármacos em *M. tuberculosis*. Este é um método direto que permite detectar mutações já conhecidas e identificar novas mutações. Porém, essa metodologia não é utilizada em rotina, pois ela se torna muito laboriosa quando a análise envolve mais de um gene ou quando a região do gene a ser analisado é muito ampla. Já as técnicas de SSCP e RFLP têm sido usadas com mais freqüência na rotina. No entanto, elas apenas identificam a resistência aos fármacos sem caracterizar a mutação.

Os métodos disponíveis até o momento são, em sua maioria, desenvolvidos para a detecção da resistência à RMP, pois as bases genéticas desse tipo de resistência em *M. tuberculosis* estão bem caracterizadas, enquanto as bases genéticas dos outros fármacos da primeira linha são muito mais complexas. Além disso, a RMP^R pode ser freqüentemente usada como um marcador da TB MDR.

O kit Inno-LiPA Rif.TB[®] (Inno-genetics, Bélgica) detecta especificamente a resistência à RMP em *M. tuberculosis*. O teste é baseado no princípio de hibridização de fase sólida reversa e consiste na amplificação por PCR de um segmento do gene *rpoB*, desnaturação e hibridização dos amplicons com sondas imobilizadas em localizações conhecidas, sob condições rigidamente controladas. O Kit InnoLiPA[®] contém cinco sondas para o tipo selvagem, isto é, linhagem sensível, e quatro sondas para mutações específicas no gene *rpoB* (Figura 2). A interpretação do padrão de bandas permite a identificação do complexo *M. tuberculosis* e a detecção das mutações no gene *rpoB*. O teste pode ser reali-

zado em isolados a partir de cultura ou de espécimes clínicos, e seu tempo de realização é em torno de 48 horas. A concordância do InnoLiPA™ com o teste de sensibilidade fenotípico e com o seqüenciamento é alta quando realizado a partir de cultura, variando de 92,2% a 99%.³²

A tecnologia de DNA *microarray* pode ser usada também para a detecção de mutações associadas à resistência aos fármacos em *M. tuberculosis*. Já foram publicados alguns estudos mostrando a sua eficiência.^{13,37} Está em desenvolvimento um teste baseado nessa metodologia que objetiva a detecção simultânea de vários determinantes da resistência aos fármacos isoniazida, estreptomicina e fluoroquinolonas. Esse teste contém seqüências dos genes mais freqüentemente associados à resistência.¹³ Essa estratégia tem potencial para se tornar um método eficiente e rápido para a detecção de TB resistente.

As vantagens oferecidas pelos métodos moleculares são bastante promissoras, porém deve-se ter claro que as bases genéticas da resistência ainda não estão esclarecidas em sua totalidade para todos os fármacos usados no tratamento da TB. Pode-se dizer que a detecção de uma mutação associada à resistência é clinicamente importante, mas a ausência de mutação nos genes-alvo não significa necessariamente que o microorganismo em questão seja sensível.

Isto se torna relevante quando se observam os resultados obtidos em relação à resistência a RMP e INH. A detecção molecular de mutação no gene envolvido com a resistência à RMP, utilizando seqüenciamento ou InnoLiPA™, confirma o fenótipo resistente em mais de 90% dos casos.³⁸ Porém, para a INH, essa correlação é bem mais complexa, devido ao número de genes envolvidos na resistência. Quando se considera, por exemplo, o gene *katG*, no qual é

detectado o maior número de mutações (Tabela), os resultados dependem ainda de outros fatores, como a região geográfica do isolado. Estudos em isolados de *M. tuberculosis* obtidos no Brasil demonstram que existem variações significativas (50-80%) dependendo da região geográfica em que o bacilo foi isolado.*

Outra dificuldade encontrada para a utilização dessa metodologia na rotina laboratorial é a falta de testes comerciais. O único disponível no Brasil, o InnoLiPA™, apresenta boa aplicabilidade e fácil execução. Porém, além de seu custo elevado inviabilizar o uso na rotina, não existem estudos que comprovem sua eficácia para isolados brasileiros. Os demais testes citados ainda são utilizados basicamente para pesquisas.

Apesar disso, os métodos moleculares podem auxiliar na rápida detecção de isolados de *M. tuberculosis* resistentes, apresentando um bom potencial para a aplicação na rotina laboratorial, pois podem reduzir o tempo para a obtenção da informação referente à sensibilidade e, assim, auxiliar na escolha de uma terapia adequada.

O desenvolvimento de metodologias mais acessíveis para ser implantadas na rotina laboratorial, principalmente na rede de saúde pública, tem sido alvo de vários grupos de pesquisa, inclusive no Brasil. Têm sido realizados estudos buscando caracterizar as mutações encontradas nos isolados de *M. tuberculosis* de pacientes de diferentes regiões para, então, adequar uma metodologia de diagnóstico.

Considerando as vantagens oferecidas por essas novas metodologias e a enorme contribuição para o controle de TB, é importante que se continue ampliando o conhecimento dos mecanismos de resistência e o aperfeiçoamento das técnicas moleculares, para que possam ser aplicadas na clínica médica.

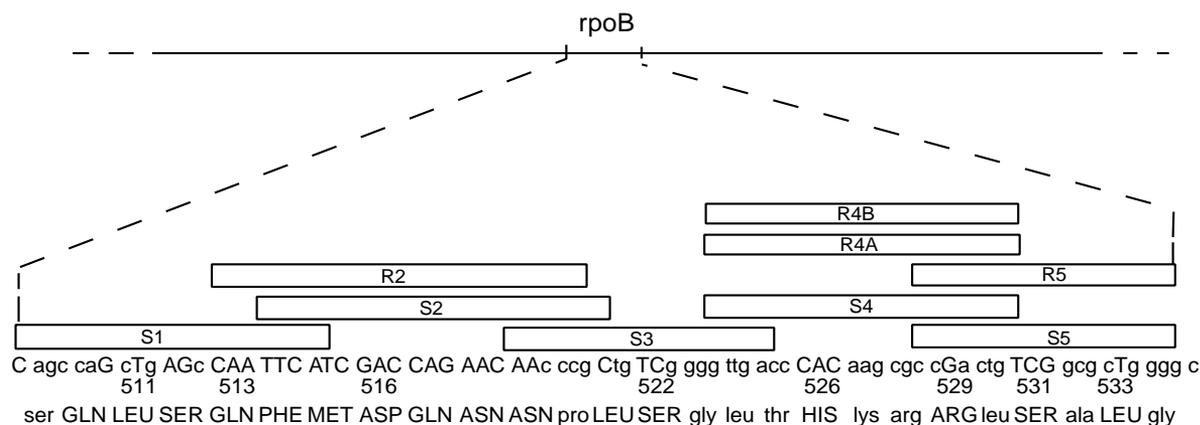


Figura 2 - Representação esquemática de funcionamento do Kit Inno-LiPA Rif. TB.

*Comunicação pessoal de Marcia S. Nunes Silva, da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, RS.

REFERÊNCIAS

1. Altamirano M, Marostenmaki J, Wong A, Fitzgerald M, Black WA, Smith JA. Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* 1994;169:1162-5.
2. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, et al. *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994;263:227-30.
3. Blanchard JS. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem* 1996;65:215-39.
4. Brennan PJ, Nakaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995;64:29-63.
5. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
6. Cooksey RC, Morlock GP, McQueen A, Glickman SE, Crawford JT. Characterization of streptomycin resistance mechanism among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1186-8.
7. Cutler RR, Wilson P, Villarreal J, Clarke, FV. Evaluating current methods for determination of the susceptibility of mycobacteria to pyrazinamide, conventional, radiometric Bactec and two methods of pyrazinamidase testing. *Lett Appl Microbiol* 1997;24:127-32.
8. David HL. Basis for lack of drug susceptibility of atypical mycobacteria. *J Infect Dis* 1981;3:878-84.
9. Dobner P, Rush-Gerdes S, Bretzel G, Feldmann K, Rifai M, Loscher P et al. Usefulness of *Mycobacterium tuberculosis* genomic mutations in the genes *katG* and *inhA* for the prediction of isoniazid resistance. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:365-9.
10. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Ravigione MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 1999;282:677-86.
11. Finken M, Kirshner P, Meier A, Wrede A, Bottger E. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* 1993;9:1239-46.
12. Garvin RT, Biswas DW, Gorini L. The effects of streptomycin or dihydrostreptomycin binding to 16S rRNA or to 30S ribosomal subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71:3814-8.
13. Gingeras TR, Ghandour G, Wang E, Berno A, Small PM, Drobniowski F. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res* 1998;8:435-48.
14. Hewlett D, Horn DL, Alfalfa C. Drug resistant tuberculosis: inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing. *JAMA* 1995;273:916-7.
15. Honoré N, Cole ST. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;11:773-9.
16. Jin DJ, Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* 1988;202:45-58.
17. Kapur V, Li LL, Londenescu S, Hamrick MR, Wanger A, Kreiswirth BN et al. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene *rpoB* encoding the RNA polymerase β subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol* 1994;32:1095-8.
18. Kelley CL, Rouse DA, Morris SL. Analysis of *ahpC* gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2057-8.
19. Khoo KH, Douglas E, Azadi P, Inamine JM, Besra GS, Mikusova K, et al. Truncated structural variants of lipoarabinomannan in ethambutol drug-resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. Inhibition of arabinan biosynthesis by ethambutol. *J Biol Chem* 1996;271:28682-90.
20. Konno K, Nagayama H, Oka S. Nicotinamidase in mycobacteria: a method for distinguishing bovine type tubercle bacilli from other mycobacteria. *Nature* 1959;184:1743-4.
21. Mdluli K, Slayden RA, YaQi Z, Ramaswamy S, Pan X, Mead D, et al. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl ACP Synthase by Isoniazid. *Sci Mag* 1998;280:1607-10.
22. Mestdagh M, Fonteyne PA, Realini L, Rossau R, Jannes G, Mijs W, et al. Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2317-9.
23. Middlebrook G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazid and the incidence of variants resistant to the drug *in vitro*. *Am Rev Tuberc* 1952;65:765-7.
24. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Pneumologia Sanitária. *Manual de normas para o controle da tuberculose*. 4ª ed. Brasília (DF): Fundação Nacional da Saúde; 1995.
25. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Bol Epidemiol* 1999;7:1.
26. Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, Brim SE, Sikes D, Mazurek GH, et al. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2291-5.

27. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:496-514.
28. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998;79:3-29.
29. Rinder H, Thonschke A, Rusch-Gerdes S, Bretzel G, Feldmann K, Rifai M et al. Significance of *ahpC* promoter mutations for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:508-11.
30. Scorpio A, Collins DM, Whipple D, Cave D, Bates J, Zhang Y. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J Clin Microbiol* 1997;32:106-10.
31. Snider DE-Jr, Roper WL. The new tuberculosis. *N Engl J Med* 1992;326:703-5.
32. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem* 2001;47:809-14.
33. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer k, Williams D, Kreiswirth B, Musser JM. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographical localities. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1024-6.
34. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM. Mutations associated with pyrazinamidase resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:636-40.
35. Telenti A, Iseman M. Drug resistant tuberculosis. What do we do now? *Drugs* 2000;59:171-9.
36. Telenti A, Imboden F, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2054-8.
37. Troesch A, Nguyen H, Miyada S, Gingeras TR, Kaplan PM, Cros P, et al. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* 1999;37:49-55.
38. Valim ARM, Rossetti MLR, Ribeiro MO, Zaha A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brasil. *J Clin Microbiol* 2000;38:3119-22.
39. Varedzic BP, Grosset J, de Kantor I, Crofton J, Laszlo A, Felten M et al. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization Recommendations. *Tuber Lung Dis* 1994;75:1-7.
40. Wengenack NL, Todorovic S, Yu L, Rusnak F. Evidence for differential binding of isoniazid by *Mycobacterium tuberculosis katG* and the isoniazid-resistant mutant *katG* (S315T). *Biochemistry* 1998;37:15825-34.
41. Willians DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, et al. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2380-6.
42. Wilson TM, Collins DM. *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol Microbiol* 1996;19:1025-34.
43. World Health Organization. *Global tuberculosis control: WHO report*. Geneva; 1999.
44. Zhang Y, Telenti A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Hatfull GF, Jacobs WR-Jr. *Molecular of mycobacteria*. Washington (DC): ASM Press; 2000. p. 235-54.
45. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance of *M. tuberculosis*. *Nature* 1992;385:591-3.