

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Tuberculose Multirresistente em Lisboa

João Ruben Lucas Perdigão

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

LISBOA
2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Tuberculose Multirresistente em Lisboa

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Isabel Portugal e pela
Prof. Doutora Rita Zilhão

João Ruben Lucas Perdigão

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

LISBOA
2007

Publicações no âmbito deste trabalho:

J. Perdigão; R. Macedo; L. Brum; I. Portugal. 2007. *Occurrence of embB306 mutations in ethambutol-resistant and –susceptible Mycobacterium tuberculosis clinical isolates.* MicroBiotec XXXIIIJPG 2007. Lisboa, Portugal

J. Perdigão; R. Macedo; E. Fernandes; L. Brum; I. Portugal. 2007. *Mutations associated with streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis: predominance and rapid detection in Lisbon, Portugal.* MicroBiotec XXXIIIJPG 2007. Lisboa, Portugal

J. Perdigão; R. Macedo; I. João; E. Fernandes; L. Brum; I. Portugal. 2007. *Multidrug-Resistant Tuberculosis in Lisbon: Molecular Epidemiology and Resistance . 4th Congress of the European Society for Emerging Infections.* Lisboa, Portugal

J. Perdigão; R. Macedo; L. Brum; I. Portugal. 2007. *Mutational Characterization of Ethambutol Resistance-Determinating Region in Ethambutol-Resistant Isolates: Prevalence of embB306 Mutations and their role in ethambutol resistance.* 28th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology. Atenas, Grécia

J. Perdigão; R. Macedo; L. Brum; I. Portugal. 2007. *Rapid Detection of Pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in Portugal . 28th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology.* Atenas, Grécia

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Isabel Portugal, que orientou este trabalho, pela sua confiança, disponibilidade e amizade.

À Professora Doutora Laura Brum, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, pela confiança demonstrada.

À Professora Doutora Rita Zilhão, que orientou este trabalho internamente na FCUL, pela sua disponibilidade e aconselhamento.

À Dra. Rita Macedo pela amizade e auxílio, tendo a sua contribuição para este trabalho sido fundamental.

À Dra. Elisabete Fernandes e Dra. Ana Garcia pela colaboração e auxílio prestado.

Às Técnicas Paula Cristóvão e Lúcia Reis pela colaboração e disponibilidade.

À Dra. Ana Luísa Ribeiro pelo auxílio prestado na execução de parte do trabalho.

Aos colegas de laboratório na Faculdade de Farmácia, Catarina, Lena, Pedro, Cheila, Inês, Daniela, Hugo e Filipa pelo auxílio sempre que foi necessário e também, pelo bom ambiente de trabalho.

Por último, aos meus pais, irmão e avó por todo o seu apoio.

RESUMO

Portugal apresenta a quarta maior taxa de incidência de tuberculose da União Europeia, 31 casos por cada 100 000 habitantes em 2005. A Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, composta pelos distritos de Lisboa, Santarém e Setúbal, apresenta-se como uma das regiões com maior incidência do país. O distrito de Lisboa em particular apresenta uma taxa de 38,6 casos por cada 100 000 habitantes. A situação é ainda agravada pelas elevadas taxas de multirresistência, que representam não só uma séria ameaça ao controlo da tuberculose, como também constituem um elevadíssimo encargo para o sistema nacional de saúde.

O estudo presente teve como finalidade avaliar a situação na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo relativamente à dinâmica de transmissão da tuberculose resistente e aquisição da resistência.

Foram analisados 94 isolados clínicos resistentes a um ou mais antibacilares de primeira linha. Estes isolados foram genotipados pela técnica de MIRU-VNTR e caracterizados relativamente aos genes associados à resistência a antibacilares de primeira linha: *inhA*, *katG*, *rpoB*, *rpsL*, *rrs*, *embB* e *pncA*. Foram ainda analisados os perfis de resistência a antibacilares de primeira e segunda linha.

No decorrer do trabalho foram estabelecidas as mutações mais prevalentes associadas à resistência a antibacilares de primeira linha. Verificou-se que a maioria das estirpes multirresistentes que circula na região continua a pertencer à família Lisboa, descrita há mais de 10 anos, e cuja falha na contenção assegurou uma crescente aquisição de resistência. A maioria destas estirpes é agora extensivamente resistente.

Dos isolados multirresistentes estudados, 48,7% eram extensivamente resistentes. Foi ainda detectado um possível surto ou emergência de uma nova estirpe extensivamente resistente.

Os *clusters* genéticos encontrados puderam ser discriminados recorrendo às mutações encontradas. Tal, permitiu igualmente a avaliação da dinâmica de aquisição de resistência pelas várias estirpes.

Palavras-chave: tuberculose, multirresistência, resistência extensiva, epidemiologia molecular, família Lisboa.

ABSTRACT

Portugal has the fourth highest tuberculosis incidence rate of the European Union, 31 cases per 100 000 inhabitants in 2005. The Health Region of Lisboa e Vale do Tejo, composed by Lisboa, Santarém and Setúbal districts, is one of the regions with the highest incidence. Lisbon district for example, has an incidence rate of 38,6 cases per 100 000 inhabitants. The situation is further worsened by the high rates of multidrug-resistance, which pose not only a serious threat to tuberculosis control, as also constitute a high expense for the national health system.

The present study had the purpose to evaluate the dynamics of resistant tuberculosis transmission and resistance acquisition in the Health Region of Lisboa e Vale do Tejo.

Ninety-four clinical isolates, resistant to one or more first-line drugs, were analyzed. These isolates were genotyped by MIRU-VNTR and the genes associated with first-line drug resistance (*inhA*, *katG*, *rpoB*, *rpsL*, *rrs*, *embB* and *pncA*) were characterized. The resistance profiles to first- and second-line drugs were also evaluated.

This work has established the most prevalent mutations associated with first-line drug resistance. It was verified that the majority of the multidrug-resistant strains circulating in the region still belong to Lisboa family, a family of multidrug resistant strains described more than 10 years ago. The non-containment of such strains ensured an increasing resistance acquisition, as the majority of these strains are now extensively drug-resistant.

From the studied multidrug-resistant isolates, 48,7% were extensively drug-resistant. A possible outbreak or emergence of a new extensively drug-resistant strain was detected.

The genetic clusters found were further discriminated by using the drug resistance-associated mutations as additional genetic markers. Such, has also allowed an evaluation of the dynamics of resistance acquisition by several strains.

Keywords: tuberculosis, multidrug-resistance, extensive-drug resistance, molecular epidemiology, Lisboa family.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
• 1.1 Situação da Tuberculose em Portugal e no Mundo	1
• 1.2 Resistência em <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
• 1.3 Epidemiologia Molecular	4
2. OBJECTIVOS.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
• 3.1 Isolados clínicos, teste de susceptibilidade a antibióticos e preparação de DNAs.....	7
• 3.2 Caracterizações génicas.....	8
• 3.4 Genotipagem por MIRU-VNTR e <i>clustering</i>	11
4. RESULTADOS.....	11
• 4.1 Caracterização da amostra.....	11
• 4.2 Perfis de Resistência.....	12
• 4.3 Caracterização Mutacional de Isolados Resistentes.....	14
• 4.4 Genotipagem por MIRU-VNTR – <i>clusters</i> genéticos.....	15
• 4.5 Análise mutacional de clusters	17
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO.....	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica por país da incidência anual estimada de novos casos de tuberculose no mundo (extraído de WHO, 2007).....	1
Figura 2 – Distribuição geográfica da incidência anual de novos casos de tuberculose por distrito em 2005 (extraído de DGS, 2007)	2
Figura 3 - Esquema do cromossoma de <i>M. tuberculosis</i> e sequencias polimórficas utilizadas em epidemiologia molecular, locais de restrição da enzima <i>PvuII</i> (a); <i>IS6110</i> (b); sonda para sequência <i>IS6110</i> (c); MIRUs (d). (Adaptado de Barnes e colaboradores, 2003).	5
Figura 4 – Proveniência dos 94 isolados clínicos analisados neste estudo.	11
Figura 5 – Distribuição dos 94 doentes por sexo.	12
Figura 6 – Prevalência dos diferentes tipos de perfis de resistência a antibacilares de primeira linha encontrados nos 94 isolados estudados; I – Isoniazida, R – Rifampicina, E – Etambutol, S – Estreptomicina e, P – Pirazinamida.....	13
Figura 7 – Prevalência dos diferentes tipos de perfis de resistência a antibacilares de segunda linha encontrados nos 39 isolados clínicos multirresistentes testados quanto à susceptibilidade aos antibacilares de segunda linha; CAP – Capreomicina, AMK – Amicacina, KAN – Canamicina; CIP – Ciprofloxacina, OFL – Ofloxacina, ETH – Etionamida e, PAS – Ácido para-amino salicílico.	13
Figura 8 – Dendrograma baseado nos perfis de MIRU-VNTR de 94 isolados clínicos resistentes a um ou mais antibacilares. Isoniazida, I; Rifampicina, R; Estreptomicina, S; Etambutol, E; Pirazinamida, P.	16

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Notificações de incidência e mortalidade por tuberculose estimadas nas diferentes regiões OMS em 2005 (adaptado de WHO, 2007).	2
Tabela 2 – Oligonucleótidos utilizados nas caracterizações gênicas.....	10
Tabela 3 – Mutações associadas à resistência encontradas nos vários genes pesquisados e sua prevalência na amostra.....	15
Tabela 4 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do <i>cluster</i> B1	17
Tabela 5 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do <i>cluster</i> B2	17
Tabela 6 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do <i>cluster</i> Lx4	17
Tabela 7 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do <i>cluster</i> Lx1	18
Tabela 8 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do <i>cluster</i> Lx2	18
Tabela 9 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do <i>cluster</i> Lx3	19
Tabela 10 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do <i>cluster</i> Q1	20

1. INTRODUÇÃO

1.1 Situação da Tuberculose em Portugal e no Mundo

O ressurgimento da tuberculose na década de 80 e 90 do século XX levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar a tuberculose como uma emergência global em 1993. Desde 1980 a 2005 cerca de 90 milhões de casos foram relatados à OMS e em 2005 foram descritos 5.1 milhões de novos casos, dos quais 79% são oriundos de 22 países com elevada incidência (WHO, 2007) (Figura 1).

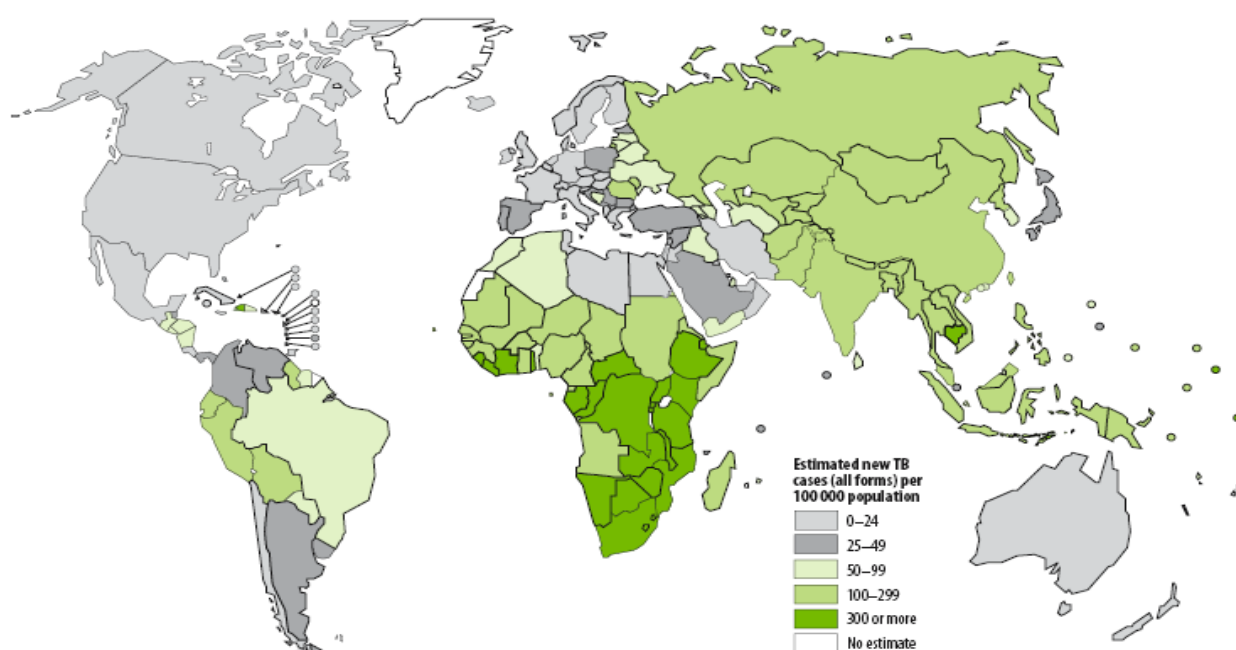


Figura 1 – Distribuição geográfica por país da incidência anual estimada de novos casos de tuberculose no mundo (extraído de WHO, 2007).

A região do sudeste asiático é aquela que apresenta o maior número de casos notificados, no entanto, é na África subsaariana que a incidência *per capita* é maior. Esta elevada incidência em África deve-se à elevada percentagem de coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). De facto, as mudanças na taxa de incidência de tuberculose nos países com elevada taxa de incidência do HIV são acompanhadas por mudanças nesta última taxa (WHO, 2007). Por oposição, é nos países com economia de mercado estabelecida que podemos encontrar as taxas de incidência mais reduzidas; é por exemplo, o caso da maioria dos países integrantes da União Europeia (UE) e dos Estados Unidos da América (EUA) (Tabela 1).

Tabela 1 – Notificações de incidência e mortalidade por tuberculose estimadas nas diferentes regiões OMS em 2005 (adaptado de WHO, 2007).

REGIÃO	POPULAÇÃO (milhares)	INCIDÊNCIA		MORTALIDADE		Prevalência HIV (%)
		Nº (milhares)	Por 100 000 Hab por ano	Nº (milhares)	Por 100 000 Hab por ano	
África	738 983	2529	343	544	74	28
Américas	890 757	352	39	49	5.5	7.9
Este Mediterrânico	541 704	565	104	112	21	2.1
Europa	882 395	445	50	66	7.4	4.6
Sudeste Asiático	1 656 529	2993	181	512	31	3.9
Pacífico Oeste	1 752 283	1927	110	295	17	1.0
Global	6 461 751	8811	136	1577	24	11

Portugal por seu lado, e apesar de estar incluído no grupo de países com economia de mercado estabelecida, apresenta taxas de incidência de tuberculose bem superiores às da média dos restantes países da UE. A taxa de incidência de tuberculose em Portugal tem vindo a diminuir ao longo dos últimos 20 anos, porém, esta diminuição tem-se vindo a efectuar muito lentamente. Portugal permanece, por essa razão, o quarto país da UE com as mais elevadas taxas de incidência de tuberculose (DGS, 2007).

Em 2005, a taxa de incidência média nacional foi de 31 casos por cada 100000 habitantes. São cinco os distritos que apresentam taxas de incidência superiores à média nacional: Beja, Faro, Lisboa, Porto e Setúbal (Figura 2) (DGS, 2007).

Outro factor a ter em consideração é a distribuição dos casos existentes por grupo etário. A mediana de idades dos casos de tuberculose activa tem vindo a deslocar-se para idades superiores, o que traduz uma redução da força de infecção na comunidade e da endemicidade da doença. No entanto, a mediana de idades, em Portugal, encontra-se ainda aquém da mediana de idades da UE no seu conjunto (DGS, 2007).

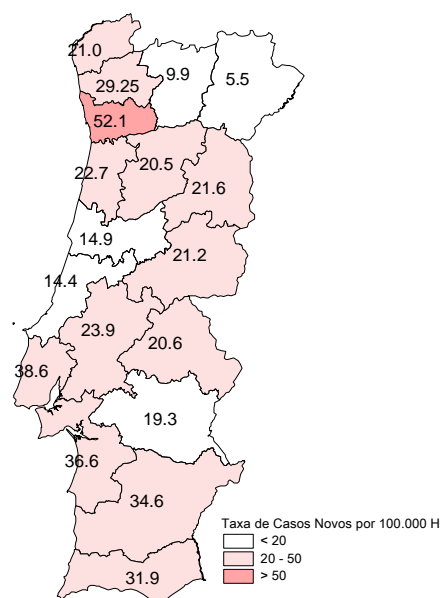


Figura 2 – Distribuição geográfica da incidência anual de novos casos de tuberculose por distrito em 2005 (extraído de DGS, 2007)

1.2 Resistência em *Mycobacterium tuberculosis*

Apesar de a tuberculose não ser considerada uma doença emergente, a tuberculose multirresistente (resistência a pelo menos à isoniazida e rifampicina) ou extensivamente

resistente (XDR-TB) (multirresistência com resistência adicional a uma fluoroquinolona e a um antibacilar injectável de segunda linha) podem sê-lo (WHO, 2006).

O único mecanismo conhecido pelo qual pode haver desenvolvimento de resistência por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) é através de aquisição de mutações em genes associados à resistência a vários antibacilares. São cinco os antibacilares de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose: isoniazida, rifampicina, estreptomocina, etambutol e pirazinamida, e vários os genes que podem estar associados à resistência a estes antibacilares.

A resistência à isoniazida pode advir de mutações em vários genes. Cerca de 42-58% dos isolados clínicos resistentes à isoniazida apresentam mutações no gene *katG*, cujo produto génico é uma catalase-peroxidase (Somoskovi e colaboradores, 2001; Coll e colaboradores, 2003; Cardoso e colaboradores, 2004). A mutação mais frequente é a mutação Ser315Thr no gene *katG* e ocorre em aproximadamente 40% das estirpes, ficando a catalase-peroxidase incapaz de activar a isoniazida. Isolados que apresentam outras mutações no gene *katG* conferem, consoante a mutação, um grau de resistência variável à isoniazida (Parsons e colaboradores, 2005). Existem ainda outros genes associados à resistência a este antibacilar, nomeadamente: o gene *inhA*, cujo produto génico é uma enoil-ACP redutase e que constitui o alvo primário da isoniazida (Vilchéze e colaboradores, 2006); e o gene *ndhA*, cujo produto génico é uma NADH desidrogenase (Cardoso e colaboradores, 2004).

A resistência à rifampicina tem vindo a aumentar nos últimos anos indicando o desenvolvimento crescente de linhagens multirresistentes. A resistência a este importante antibacilar deve-se à aquisição de mutações espontâneas no gene *rpoB*, cujo produto génico é a subunidade β da RNA polimerase, numa região central bem definida de 81 pb. Pelo menos 96% dos isolados clínicos resistentes apresentam mutações nesta região, o que facilita a caracterização da resistência (Somoskovi e colaboradores, 2001; Coll e colaboradores, 2003; Rossetti e colaboradores, 2002; Williams e colaboradores, 1994; Kapur e colaboradores, 1994).

Os isolados clínicos resistentes à pirazinamida apresentam geralmente uma actividade da pirazinamidase deficiente, existindo uma boa correlação entre a perda de actividade desta enzima e a resistência à pirazinamida (Mestdagh e colaboradores, 1999; Zhang e colaboradores, 2003). A identificação do gene *pncA*, cujo produto génico é a pirazinamidase, permitiu estudar o mecanismo de resistência à pirazinamida (Zhang e colaboradores, 2003; Rodrigues e colaboradores, 2005). Entre 72 a 97% dos isolados clínicos resistentes apresentam mutações dispersas ao longo do gene *pncA* ou na região do promotor (Coll e colaboradores, 2003; Somoskovi e colaboradores, 2001; Scorpio e colaboradores, 1996; Scorpio e colaboradores, 1997; Zhang e colaboradores, 2003). Estas mutações são na sua

grande maioria mutações *missense*, alterando a sequência aminoacídica, ou em menor número, inserções ou deleções nucleotídicas e mutações *nonsense* na região estrutural ou promotora do gene (Zhang e colaboradores, 2003; Scorpio e colaboradores, 1997).

Nas micobactérias, a aquisição de resistência à estreptomicina deve-se a mutações nos genes que codificam o rRNA 16S (*rrs*) e a proteína ribossomal S12 (*rpsL*) (Coll e colaboradores, 2003; Meier e colaboradores, 1996). As mutações que conferem resistência à estreptomicina ocorrem em maior número no gene *rpsL*, conferindo um grau de resistência elevado (Coll e colaboradores, 2003; Rossetti e colaboradores, 2002; Meier e colaboradores, 1996). A mutação mais comum neste gene ocorre no codão 43 causando uma substituição de uma lisina (AAG) por uma arginina (AGG), ocorrendo em cerca de 28-56% dos isolados (Mieskes e colaboradores, 2000), havendo já estratégias de detecção desta mutação por PCR-RFLP (Fukuda e colaboradores, 1999; Mieskes e colaboradores, 2000). As mutações que ocorrem no gene *rrs* conferem uma resistência de grau intermédio e ocorrem em 8-21% dos isolados clínicos (Coll, 2003; Rossetti e colaboradores, 2002; Meier e colaboradores, 1994; Meier e colaboradores, 1996).

De todos os mecanismos de resistências aos antibacilares de primeira linha, o de resistência ao etambutol é aquele que está menos estudado, permanecendo ainda em grande parte desconhecido. Os isolados clínicos resistentes ao etambutol apresentam em cerca de 47 a 70% dos casos, mutações no gene *embB*, que codifica uma arabinosil transferase (Coll, 2003; Rossetti e colaboradores, 2002; Johnson e colaboradores, 2006; Sugawara e colaboradores, 2005; Lee e colaboradores, 2004). A maior parte das mutações no gene *embB*, ocorre no codão 306, podendo a metionina inicialmente codificada por este codão, ser substituída por uma valina, isoleucina ou leucina resultantes de cinco possíveis mutações nucleotídicas (Johnson e colaboradores, 2006; Sugawara e colaboradores, 2005; Lee e colaboradores, 2004). Hazbón e colaboradores (2005) sugerem que a mutação no codão 306 não confere resistência ao etambutol, uma vez que existem vários isolados susceptíveis que apresentam mutações neste codão, conferindo, por outro lado, uma maior propensão à aquisição de resistência a outros antibacilares e podendo inclusive funcionar como marcador para a multirresistência.

1.3 Epidemiologia Molecular

A epidemiologia molecular é definida como o estudo da distribuição e determinantes de doenças que ocorrem em populações humanas, recorrendo a técnicas de biologia molecular (Narayanan, 2004). A integração de métodos moleculares que permitem genotipar isolados

clínicos de *M. tuberculosis* permitiu obter mais informações sobre a sua propagação em miniepidemias e surtos (Narayanan, 2004).

Isolados que apresentam genótipos idênticos reflectem possivelmente casos em que houve transmissão recente, ao passo que isolados não relacionados genotipicamente reflectem casos de reactivação de uma infecção adquirida no passado (Barnes e colaboradores, 2003). Porém, os dados genotípicos devem ser interpretados à luz da informação epidemiológica disponível e devem considerar a avaliação de uma grande percentagem dos casos na população durante um longo período de tempo (Barnes e colaboradores, 2003). A epidemiologia molecular pode assim fornecer dados sobre a dinâmica de transmissão da tuberculose, distinguir reinfecção exógena de reactivação endógena, identificar a fonte de contaminações laboratoriais, determinar os factores de risco para a transmissão da tuberculose na comunidade, seguir a distribuição geográfica e propagação de clones com importância em saúde pública e ainda informar sobre a disseminação internacional e mudanças evolucionárias nas populações de *M. tuberculosis* (Supply e colaboradores, 2001; Barnes e colaboradores, 2003; Narayanan, 2004).

A técnica de genotipagem que está padronizada para estudos epidemiológicos da tuberculose é a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (recorrendo à enzima *PvuII*) combinada com uma hibridação Southern, usando como sonda a sequência de inserção *IS6110* (Barnes e colaboradores, 2003; Narayanan, 2004) (Figura 3).

A técnica de RFLP-*IS6110* é ainda na actualidade aquela que apresenta um maior poder discriminatório (Blackwood e colaboradores, 2004), apresentando, no entanto, algumas desvantagens relativamente a outras técnicas existentes. É uma técnica que requer uma quantidade de DNA relativamente grande (2µg) que tem de ser extraído de bactérias em cultura; em isolados com menos de seis cópias de *IS6110*, o poder discriminatório torna-

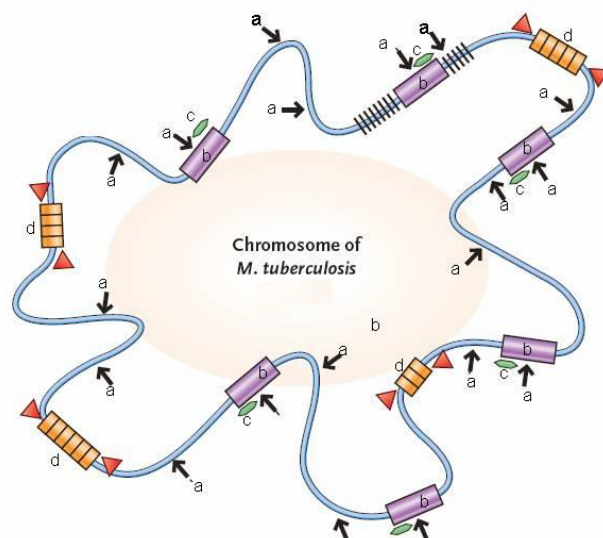


Figura 3 - Esquema do cromossoma de *M. tuberculosis* e sequências polimórficas utilizadas em epidemiologia molecular, locais de restrição da enzima *PvuII* (a); *IS6110* (b); sonda para sequência *IS6110* (c); MIRUs (d). (Adaptado de Barnes e colaboradores, 2003).

se bastante baixo; é uma técnica morosa, sendo ainda de difícil comparação interlaboratorial (Barnes e colaboradores, 2003; Blackwood e colaboradores, 2004; Narayanan, 2004).

Mais recentemente, foi desenvolvido um método de genotipagem baseado em PCR, cujos resultados são obtidos na forma de um código numérico. Esta nova técnica, designada por MIRU-VNTR (*mycobacterial interspersed repetitive unit - variable number tandem repeat*), assenta no facto de o genoma de *M. tuberculosis* possuir, em regiões intergénicas, repetições nucleotídicas de número variável em *tandem* (VNTR) designadas por MIRUs (Figura 3), que apresentam um tamanho pequeno (40-100 pb) (Barnes e colaboradores, 2003; Blackwood e colaboradores, 2004; Narayanan, 2004). A caracterização do número de repetições de cada um destes *loci* permite dessa forma caracterizar uma dada estirpe através da atribuição de um código numérico que varia de estirpe para estirpe.

A técnica de MIRU-VNTR tem sido descrita como possuindo um poder discriminatório ligeiramente inferior ao da técnica de RFLP-IS6110 (Barnes e colaboradores, 2003; Blackwood e colaboradores, 2004). No entanto, Supply e colaboradores (2006) sugeriram recentemente, numa tentativa de padronização da técnica, uma nova combinação de 15 MIRUs com poder discriminatório igual à da técnica de RFLP-IS6110. A técnica de MIRU-VNTR torna-se especialmente útil na discriminação de isolados que apresentam menos de seis sequências IS6110, como acontece com *Mycobacterium bovis*.

A técnica de MIRU-VNTR apresenta ainda a vantagem de ser uma técnica mais rápida, de fácil comparação interlaboratorial e que requer uma pequena quantidade de DNA (20 ng) podendo ser realizada a partir da amostra clínica (Barnes e colaboradores, 2003; Blackwood e colaboradores, 2004). Existe uma tendência para que no futuro, a tipagem por MIRU venha a substituir totalmente a técnica de RFLP-IS6110 no que concerne à epidemiologia da tuberculose, nomeadamente com a introdução de MIRUs adicionais (Supply e colaboradores, 2001; Blackwood e colaboradores, 2004).

2. OBJECTIVOS

Portugal apresenta uma taxa de notificação de novos casos superior à média da União Europeia, o mesmo acontecendo relativamente à taxa de casos de tuberculose com multirresistência primária. Dada essa realidade, são necessários estudos que melhorem o conhecimento actual da transmissão da tuberculose multirresistente. O presente estudo segue essa linha de investigação e, pretende contribuir com o conhecimento acerca da situação da tuberculose multirresistente na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo. Assim, este estudo tem como objectivos concretos:

1. Genotipagem, por MIRU-VNTR, de isolados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de vários laboratórios hospitalares ou de Centros de Diagnóstico Pneumológico, enviados para o laboratório de Micobactérias do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge;
2. Avaliação do impacto de *clusters genéticos* predominantes e emergentes na epidemiologia da tuberculose a nível regional;
3. Pesquisa e determinação da prevalência de mutações associadas à resistência aos antibacilares de primeira linha: isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol e pirazinamida;
4. Avaliação da dinâmica de aquisição de resistência aos diversos antibacilares, por parte de determinadas estirpes, na comunidade;
5. Associação de mutações específicas à multirresistência ou, a *clusters genéticos* específicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados clínicos, teste de susceptibilidade a antibacilares e preparação de DNAs

Noventa e quatro isolados clínicos de *M. tuberculosis*, cada um correspondendo a um paciente diferente, foram recebidas para análise na Unidade de Micobactérias do Centro de Bacteriologia Dr. Arnaldo Sampaio, no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Os isolados foram recolhidos durante o ano de 2004 e são um subconjunto de 214 isolados clínicos resistentes recebidos nesse mesmo ano, tendo os restantes perdido a viabilidade. A cultura dos isolados foi feita em Lowenstein-Jensen e, no sistema automatizado fluorimétrico BACTEC® 960 MGIT®. A identificação do isolado como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* foi realizada pelo sistema Accuprobe (Gen-Probe®).

Os isolados foram testados quanto à susceptibilidade aos antibacilares de primeira linha, utilizando a metodologia do sistema automatizado BACTEC® 960 MGIT® para, a isoniazida (0,1 µg/ml), rifampicina (1,0 µg/ml), estreptomicina (1,0 µg/ml), etambutol (5,0 µg/ml) e pirazinamida (100 µg/ml), de acordo com as instruções do fabricante. Isolados resistentes à

isoniazida e rifampicina foram considerados multirresistentes e, testados pela metodologia do sistema semi-automatizado radiométrico BACTEC[®] 460 quanto à susceptibilidade aos antibióticos de segunda linha para, a capreomicina (1,25 µg/m), amicacina (1,0 µg/m), canamicina (5,0 µg/m), ciprofloxacina (1,0 µg/m), ofloxacina (2,0 µg/m), etionamida (5,0 µg/m) e ácido para-amino salicílico (4,0 µg/m).

O DNA dos isolados acima foi extraído através de um processo rápido de extração. Uma ansa carregada de cultura bacteriana foi suspensa em TE, tendo esta suspensão sido inativada por aquecimento a 100°C durante 15 minutos, e depois submetida a um banho de ultra-sons durante 15 minutos. A suspensão obtida foi centrifugada a 13 000 rpm durante 10 minutos, tendo o sobrenadante sido utilizado nas reações de biologia molecular subsequentes.

3.2 Caracterizações génicas

Vários genes associados à resistência a antibióticos de primeira linha dos isolados estudados foram amplificados e caracterizados de acordo com o respectivo perfil de resistência. O gene *katG* e a região reguladora do operão *mabA-inhA* foram caracterizados nos isolados clínicos resistentes à isoniazida; a região determinante da resistência à rifampicina do gene *rpoB* em isolados resistentes à rifampicina; os genes *rpsL* e *rrs* em isolados resistentes à estreptomicina; a região determinante da resistência ao etambutol no gene *embB* em isolados resistentes ao etambutol; e o gene *pncA* e sua região promotora em isolados resistentes à pirazinamida. Todas as reações de amplificação foram realizadas utilizando PuReTaq[™] Ready-To-Go[™] PCR beads (GE Healthcare[®]) com 10 pmol de cada um dos *primers* e 2µl do DNA extraído.

Um fragmento interno de 620pb (904-1523) do gene *katG* foi amplificado por PCR utilizando os *primers* katG904F e katG1523R, nas seguintes condições de amplificação: 2 minutos de desnaturação a 94°C; seguidos de 50 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de *annealing* a 60°C e, 1 minuto de extensão a 72°C. As sequências dos *primers* utilizados podem ser consultadas na Tabela 2.

A região reguladora do operão *mabA-inhA* (posições -168 a 80) foi amplificada utilizando os *primers* mabA-inhA-F e mabA-inhA-R, nas seguintes condições de amplificação: 5 minutos de desnaturação a 94°C; seguidos de 30 ciclos de 5 minutos de desnaturação a 94°C, 1 minuto de *annealing* a 65°C e, 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72°C; e por último, um período de extensão final a 72°C durante 10 minutos.

A região compreendida entre os nucleótidos 2201 e 2615 do gene *rpoB* foi amplificada por PCR utilizando os *primers* TR1 e RPOB-2 nas seguintes condições de amplificação: 4

minutos de desnaturação a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de *annealing* a 60°C, e extensão durante 1 minuto a 72°C; e por último, um período de extensão final de 15 minutos a 72°C.

O gene *rpsL* foi amplificado na totalidade por PCR utilizando os *primers* RPSL-1 e RPSL-2 através de 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 2 minutos de *annealing* a 57°C e 2 minutos de extensão a 72°C.

A região compreendida entre os nucleótidos 10 e 1037 do gene *rrs* foi amplificada por PCR utilizando os *primers* RRS-1 e RRS-2, através de 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 2 minutos de *annealing* a 60°C e 2 minutos de extensão a 72°C.

A região compreendida pelos nucleótidos 643 e 1156 do gene *embB* foi amplificada por PCR utilizando os *primers* EmbB3 e EmbB4, nas seguintes condições de amplificação: 2 minutos de desnaturação a 94°C; 16 ciclos de desnaturação durante 30 segundos a 94°C, 1 minuto de *annealing* a 67°C e 30 segundos de extensão a 72°C; 22 ciclos de desnaturação durante 30 segundos a 94°C, 50 segundos de *annealing* a 65,5°C e 30 segundos de extensão a 72°C; por último, um período de extensão final de 10 minutos a 72°C.

O gene *pncA* foi amplificado na totalidade por PCR utilizando os *primers* PNCA-8 e PNCA-11, nas seguintes condições de amplificação: 5 minutos de desnaturação a 94°C; 20 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 68°C com diminuição de 0,5 °C por ciclo e, extensão durante 30 segundos a 72°C; 15 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 58°C, e extensão durante 30 segundos a 72°C; por último, um período de extensão final de 8 minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação, após confirmação de amplificação através da visualização em gel de agarose a 1,5% (p/v) foram purificados através de colunas *Microspin*[™] S-300 HR (Amersham Biosciences) segundo as indicações do fabricante, novamente visualizados em gel de agarose a 1,5% e de seguida sequenciados utilizando os *primers* katG904F para o gene *katG*; mabA-inhA-F para a região reguladora de *mabA-inhA*; RPOB-1 para o gene *rpoB*; RPSL-1 para o gene *rpsL*; RRS-1 e RRS-2 para o gene *rrs*; EmbB3 para o gene *embB*; e, PNCA-6, PNCA-10, PNCA-11 e PNCA-2R para o gene *pncA*. Os produtos resultantes da amplificação foram sequenciados através de um sequenciador automático *AbPrism*[®] 3130XL *Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*[®], Foster City, USA) e a análise das seqüências realizada através do programa *Sequencing Analysis v5.2* (*Applied Biosystems*, Foster City, USA).

As seqüências obtidas foram alinhadas com os respectivos alelos selvagens de *M. tuberculosis* H37Rv, utilizando o programa CLC Free Workbench (CLC Bio[®], Aarhus C, Denmark) e os alinhamentos analisados através do programa BioEdit (v.7.0.5.2, T.A. Hall).

Tabela 2 – Oligonucleótidos utilizados nas caracterizações génicas

	Sequência	T _m (°C)	Referência
EmbB3	5'-CCGACCACGCTGAAACTGCT -3'	68,3	Presente estudo
EmbB4	5'-AGTAGGCGGGTTTGTCTGGC -3'	67,0	Presente estudo
katG904F	5'-AGCTCGTATGGCACCGGAAC-3'	68,4	Uhl e colaboradores (1996)
katG1523R	5'-TTGACCTCCCACCCGACTTG -3'	69,5	Uhl e colaboradores (1996)
mabA-inhA-F	5'-CCTCGCTGCCAGAAAGGGA -3'	66,6	Coll e colaboradores (2005)
mabA-inhA-R	5'-ATCCCCCGGTTTCCTCCGGT-3'	66,6	Coll e colaboradores (2005)
PNCA-2R	5'-GAACACCGCCTCGATTGCCG-3'	74,0	Hannan e colaboradores (2001)
PNCA-8	5'-GGTTGGGTGGCCGCCGGTCAG-3'	80,2	Hannan e colaboradores (2001)
PNCA-6	5'-CCTCGTCGTGGCCACCGC-3'	75,0	Hannan e colaboradores (2001)
PNCA-10	5'-GCTGGTCATGTTTCGCGATCG -3'	71,3	Hannan e colaboradores (2001)
PNCA-11	5'-GCTTTGCGGCGAGCGCTCCA -3'	78,6	Hannan e colaboradores (2001)
RPOB-1	5'-GGGAGCGGATACCACCC-3'	73,0	Portugal e colaboradores (1999a)
RPOB-2	5'-GCGGTACGGCGTTTCGAT-3'	73,1	Portugal e colaboradores (1999a)
RPSL-1	5'-GGCCGACAAACAGAACGT-3'	63,8	Persing e colaboradores (1996)
RPSL-2	5'-GTTCACTCAACTGGGTGAC-3'	58,8	Persing e colaboradores (1996)
RRS-1	5'-GAGAGTTTGAATCCTGGCT-3'	62,9	Persing e colaboradores (1996)
RRS-2	5'-TGACACAGGCCACAAGG-3'	72,5	Persing e colaboradores (1996)
TR1	5'-TACGGTCGGCGAGCTGAT-3'	71,7	Portugal e colaboradores (1999a)

3.3 Análise por RFLP

De modo a detectar rapidamente algumas mutações associadas a resistência, sem recurso à sequenciação, foram realizadas análises por RFLP, seguidas de electroforese em gel de agarose para análise do padrão de restrição. Mutações S315T e R463L, no gene *katG*, foram detectadas por hidrólise do produto de amplificação do gene *katG* com *MspI*. Duas microgramas do produto de PCR foram hidrolisadas utilizando 10U de *MspI* de acordo com as instruções do fabricante durante uma hora a 37°C. A análise do padrão de restrição permite a detecção das mutações G944C (S315T) e G1388T (R463L) como descrito por Uhl e colaboradores (1996).

A mutação A130G (R43K) no gene *rpsL* foi detectada por hidrólise do respectivo produto de amplificação com *MbolI*. Duas microgramas do produto de PCR foram hidrolisadas utilizando 5U de *MbolI* de acordo com as instruções do fabricante durante uma hora a 37°C. A ausência de restrição é indicativa da presença da mutação A130G (R43K).

As mutações T359C e T374G no gene *pncA* foram detectadas por hidrólise com *SacII* e *BtgZI*, respectivamente. As reacções foram realizadas independentemente e sequencialmente, usando aproximadamente 1 µg de produto de PCR com 10 U de *SacII* ou com 1U de *BtgZI*, como recomendado pelo fabricante. A ocorrência de restrição é indicativa da presença da mutação testada.

3.4 Genotipagem por MIRU-VNTR e *clustering*

A genotipagem por MIRU-VNTR foi realizada para cada isolado no INSA através de amplificação por PCR *multiplex* de 12 *loci* de MIRU-VNTR, usando a polimerase de DNA HotStarTaq (Quiagen®), como havia já sido previamente descrito por Supply e colaboradores (2001).

Os isolados foram agrupados em *clusters*, com base nos perfis de MIRU-VNTR obtidos, utilizando o programa BioNumerics® (Applied Maths®, Sint-Martens-Latem, Belgium). A correlação de Pearson foi utilizada para calcular a matriz de semelhanças, tendo o agrupamento sido elaborado através do algoritmo UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra

A amostra de isolados clínicos utilizada neste estudo é composta por 94 isolados clínicos de *M. tuberculosis*, recebidos no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge no decorrer do ano de 2004. Todos os isolados analisados provieram de nove Hospitais e dez Centros de Diagnóstico Pneumológico (CDP) da Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo (Figura 4). Destaca-se o Hospital Pulido Valente como origem de 27% dos isolados.

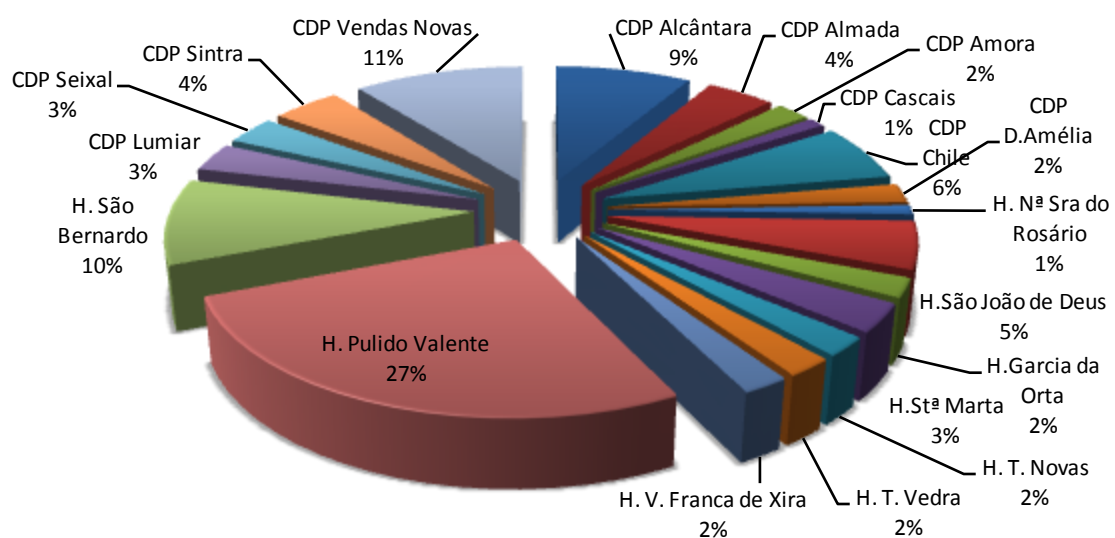


Figura 4 – Proveniência dos 94 isolados clínicos analisados neste estudo.

A distribuição dos doentes por sexo revelou uma forte concentração em indivíduos do sexo masculino (Figura 5). Para dois dos doentes não foi possível obter qualquer informação respeitante ao sexo.

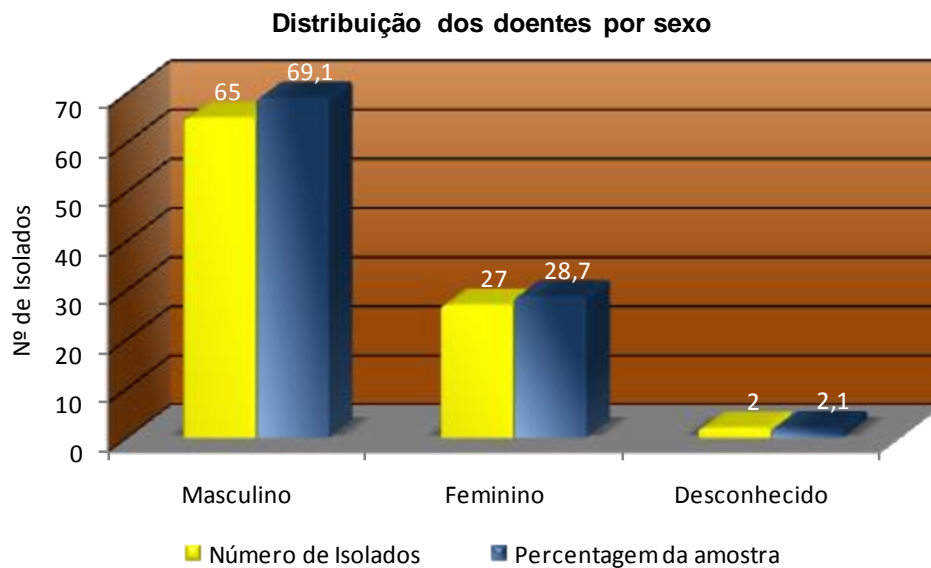


Figura 5 – Distribuição dos 94 doentes por sexo.

Procurou-se igualmente saber a serologia para o HIV dos pacientes cujos isolados foram aqui analisados. No entanto, só se conseguiu obter esta informação para uma reduzida minoria dos doentes em estudo, o que impossibilitou qualquer estudo subsequente de correlação com a co-infecção com o HIV.

4.2 Perfis de Resistência

Os isolados analisados no presente estudo foram submetidos a testes de susceptibilidade aos antibacilares de primeira linha. Verificou-se que dos 94 isolados testados, 32 (34,0%) eram monorresistentes à estreptomicina e 44 (46,8%) eram multirresistentes (Figura 6). De salientar, é o facto de 25 (26,6%) isolados serem resistentes a todos os antibacilares de primeira linha.

Perfis de resistência a antibacilares de primeira linha

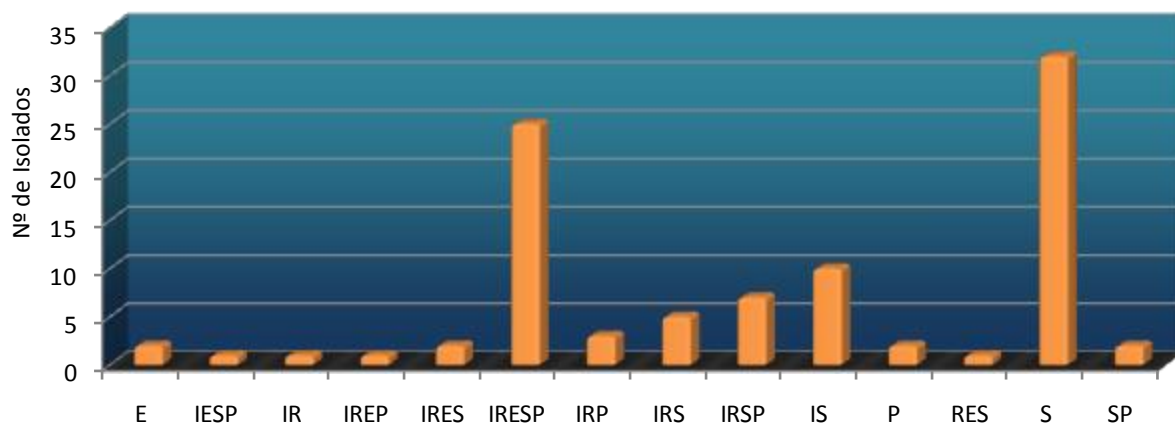


Figura 6 – Prevalência dos diferentes tipos de perfis de resistência a antibacilares de primeira linha encontrados nos 94 isolados estudados; I – Isoniazida, R – Rifampicina, E – Etambutol, S – Estreptomicina e, P – Pirazinamida.

Para além do teste de susceptibilidade aos antibacilares de primeira linha, foram realizados testes de susceptibilidade a antibacilares de segunda linha a 39 dos 44 isolados multirresistentes (Figura 7). Observou-se que 19 (48,7%) isolados apresentavam um perfil de resistência coincidente com o recém-definido conceito de resistência extensiva, i.e., multirresistência acrescida de resistência a pelo menos um antibacilar de segunda linha injectável e uma fluoroquinolona (WHO, 2006).

Perfis de resistência a antibacilares de segunda linha

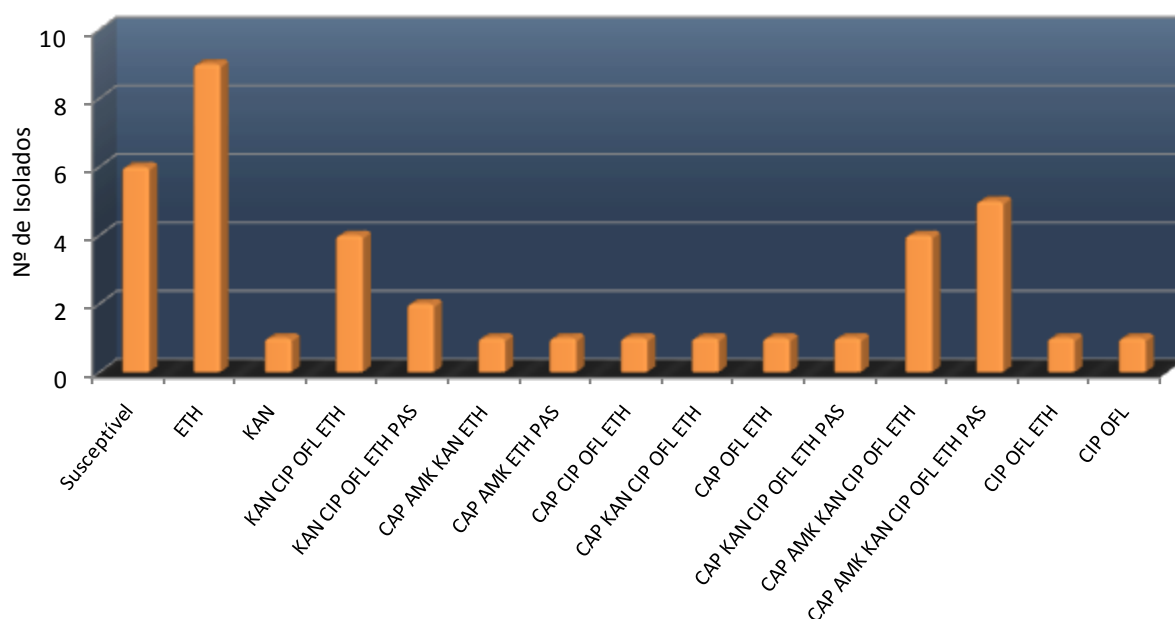


Figura 7 – Prevalência dos diferentes tipos de perfis de resistência a antibacilares de segunda linha encontrados nos 39 isolados clínicos multirresistentes testados quanto à susceptibilidade aos antibacilares de segunda linha; CAP – Capreomicina, AMK – Amicacina, KAN – Canamicina; CIP – Ciprofloxacina, OFL – Ofloxacina, ETH – Etionamida e, PAS – Ácido para-amino salicílico.

4.3 Caracterização Mutacional de Isolados Resistentes

A caracterização genética dos isolados clínicos aqui levada a cabo compreendeu uma caracterização mutacional de genes associados à resistência. Estes genes foram analisados de acordo com o perfil de resistência do isolado. Assim, em isolados resistentes à isoniazida foi caracterizado o gene *katG* e a região promotora do operão *mabA-inhA*; em isolados resistentes à rifampicina, analisou-se uma região interna do gene *rpoB* geralmente designada como região determinante de resistência à rifampicina; em isolados resistentes à estreptomicina analisou-se o gene *rpsL* e em alguns isolados, o gene *rrs*; nos isolados resistentes ao etambutol analisou-se uma região interna do gene *embB*; finalmente, para os isolados resistentes à pirazinamida caracterizou-se o gene *pncA* e respectiva região promotora. Não foi possível efectuar esta caracterização mutacional para a totalidade dos isolados resistentes devido à perda de viabilidade de alguns. Os resultados obtidos encontram-se dispostos na Tabela 3.

Para 10 dos isolados resistentes à estreptomicina em que não foram encontradas mutações no gene *rpsL*, foi pesquisada uma região correspondente compreendida entre os nucleótidos 10-1037 do gene *rrs*. Contudo, não foram encontradas mutações na região referida que pudessem estar associadas à resistência à estreptomicina.

Tabela 3 – Mutações associadas à resistência encontradas nos vários genes pesquisados e sua prevalência na amostra.

Gene	Mutação (nt)	Mutação (aa)	Nº de Isolados (%)
<i>katG</i>	Nenhuma	Nenhuma	23 (74,2)
	G854T	G285V	1 (3,2)
	A944C	S315T	7 (22,6)
	Total		31
<i>inhA</i>	Nenhuma	Nenhuma	8 (15,4)
	C-15T		44 (84,6)
Total		52	
<i>rpoB</i>	Nenhuma	Nenhuma	1 (2,3)
	2407InsC	<i>Frameshift</i>	1 (2,3)
	A2386T	D516V	3 (6,8)
	C2431T	S531L	39 (88,6)
Total		44	
<i>rpsL</i>	Nenhuma	Nenhuma	40 (50,0)
	A130G	K43R	39 (48,8)
	A265G	K88R	1 (1,3)
Total		80	
<i>embB</i>	Nenhuma	Nenhuma	15 (51,7)
	A916G	M306V	13 (44,8)
	T958G	Y319D	1 (3,4)
Total		29	
<i>pncA</i>	Nenhuma	Nenhuma	5 (15,6)
	A-11C		1 (3,1)
	T2C	M1T	5 (15,6)
	T26C	V9A	1 (3,1)
	250InsC	<i>Frameshift</i>	1 (3,1)
	282InsT	<i>Frameshift</i>	1 (3,1)
	T359C	L120P	6 (18,8)
	T374G	V125G	10 (31,3)
	412Del3pb	C138Del	2 (6,3)
Total		32	

4.4 Genotipagem por MIRU-VNTR – *clusters* genéticos

A genotipagem de todos os isolados aqui estudados foi realizada recorrendo à técnica de MIRU-VNTR, e que consistiu na caracterização do número de repetições presentes em 12 *loci* distintos, como descrito por Supply e colaboradores (2001). Ao agrupar os isolados num dendrograma construído com base neste genótipo, obtiveram-se sete *clusters* genéticos (Figura 8). Os sete *clusters* encontrados compreendem 65 (69,1%) dos 94 isolados em estudo, tendo os restantes perfis de MIRU-VNTR distintos. Observou-se que dos cinco *clusters* contendo isolados multirresistentes, quatro (Lisboa2, Lisboa3, Lisboa4 e Q1) apresentavam isolados XDR-TB.

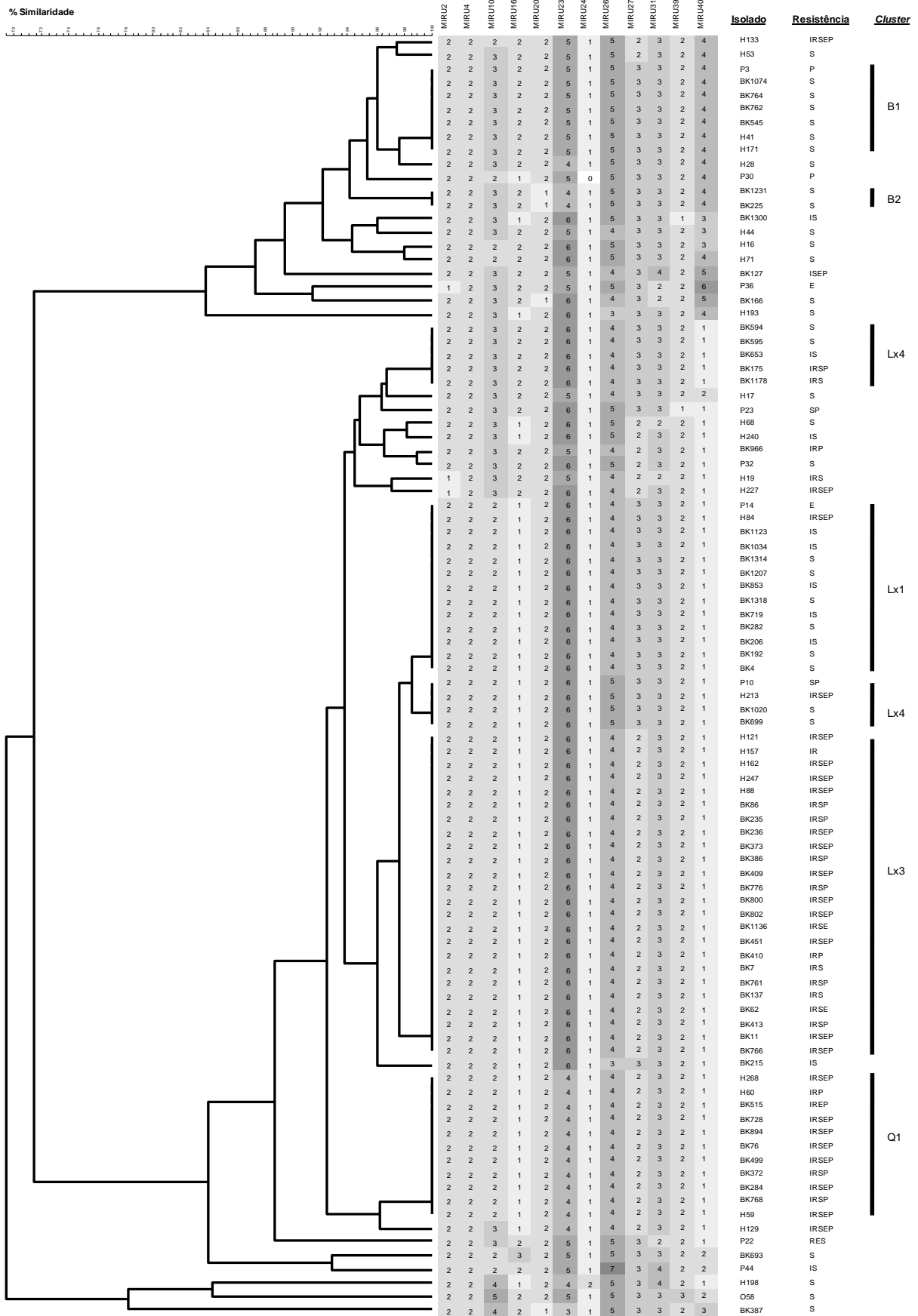


Figura 8 – Dendrograma baseado nos perfis de MIRU-VNTR de 94 isolados clínicos resistentes a um ou mais antibiomas. Isoniazida, I; Rifampicina, R; Estreptomicina, S; Etambutol, E; Pirazinamida, P.

4.5 Análise mutacional de clusters

De modo a verificar a integridade dos *clusters* encontrados e fazer uma análise discriminatória destes, compararam-se as mutações associadas à resistência encontradas em isolados clínicos pertencentes ao mesmo *cluster* genético.

Tabela 4 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do *cluster* B1

Cluster B1							
Isolado	Origem	Resistência	Mutações				
			<i>inhA</i>	RpoB	RpsL	EmbB	<i>pncA</i>
P3	P	P					s/ mut
BK1074	E	S			s/ mut		
BK764	T	S			s/ mut		
BK762	A	S			s/ mut		
BK545	F	S			s/ mut		
H41	H	S			s/ mut		
H171	H	S			s/ mut		

O *cluster* B1 é constituído por 7 isolados dos quais 6 são monorresistentes à estreptomicina e não apresentam qualquer mutação no gene *rpsL*. Um dos isolados é monorresistente à pirazinamida e não apresenta nenhuma mutação no gene *pncA* (Tabela 4).

Tabela 5 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do *cluster* B2

Cluster B2							
Isolado	Origem	Resistência	Mutações				
			<i>inhA</i>	RpoB	RpsL	EmbB	<i>pncA</i>
BK1231		S			K43R		
BK225		S			K43R		

O *cluster* B2 é constituído por apenas dois isolados clínicos monorresistentes à estreptomicina com a mesma mutação no gene *rpsL*. Ambos os isolados representam a mesma estirpe (Tabela 5).

Tabela 6 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do *cluster* Lx4

Cluster Lx4							
Isolado	Origem	Resistência	Mutações				
			<i>inhA</i>	RpoB	RpsL	EmbB	<i>pncA</i>
BK594	B	S			K43R		
BK595	E	S			s/ mut		
BK653	L	IS	C-15T		K43R		
BK175	M	IRSP	C-15T	S531L	K43R		T359C
BK1178	C	IRS	C-15T	nd	K43R		

nd – não determinado

O *cluster* Lisboa4 é constituído por 5 isolados clínicos que, embora geneticamente semelhantes, diferem ao nível das mutações e dos padrões de resistência apresentados. Este *cluster* muito provavelmente é representativo da aquisição de resistência passo a passo em que houve aquisição de resistência à estreptomicina em primeiro lugar, seguida de desenvolvimento de resistência à isoniazida, rifampicina e só depois à pirazinamida (Tabela 6).

Tabela 7 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do *cluster* Lx1

Cluster Lx1								
Isolado	Origem	Resistência	Mutações					
			<i>inhA</i>	RpoB	RpsL	EmbB	<i>pncA</i>	
P14	P	E				s/ mut		
H84	H	IRES	C-15T	S531L	K43R	s/ mut		T359C
BK1123	R	IS	C-15T		K43R			
BK1034	J	IS	C-15T		K43R			
BK1314	B	S			K43R			
BK1207	A	S			K43R			
BK853	B	IS	C-15T		K43R			
BK1318	A	S			K43R			
BK719	E	IS	C-15T		K43R			
BK282	I	S			s/ mut			
BK206	M	IS	C-15T		K43R			
BK192	D	S			K43R			
BK4	J	S			K43R			

O *cluster* Lisboa1 é constituído por 13 isolados dos quais 11 são resistentes à estreptomicina com a mutação K43R presente no gene *rpsL*. Exceptuando as estirpes representadas pelos isolados P14 e BK282, as restantes aparentam ter desenvolvido a resistência à estreptomicina em primeiro lugar através da mutação K43R e só posteriormente houve, em alguns casos, aquisição de resistência à isoniazida. A estirpe representada pelo isolado clínico H84 resulta da aquisição adicional de resistência à rifampicina, ao etambutol e à pirazinamida, embora a ordem pela qual estas diferentes resistências foram adquiridas não possa ser determinada neste *cluster* (Tabela 7).

Tabela 8 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do *cluster* Lx2

Cluster Lx2								
Isolado	Origem	Resistência	Mutações					
			<i>inhA</i>	RpoB	RpsL	EmbB	<i>pncA</i>	
P10	P	SP			s/ mut			s/ mut
H213	H	IRES	C-15T	S531L	K43R	s/ mut		421Del3pb
BK1020	T	S			s/ mut			
BK699	E	S			s/ mut			

O *cluster* Lisboa2 é constituído por 4 isolados clínicos representativos de 3 estirpes diferentes. Os isolados BK1020 e BK699 representam a mesma estirpe. Aparentemente a resistência à estreptomicina foi a primeira a desenvolver-se neste *cluster* (Tabela 8).

Tabela 9 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do *cluster* Lx3

Cluster Lx3							
Isolado	Origem	Resistência	Mutações				
			<i>inhA</i>	RpoB	RpsL	EmbB	<i>pncA</i>
H121	H	IRESP	C-15T	S531L	K43R	s/ mut	421Del3pb
H157	H	IR	C-15T	D516V			
H162	H	IRESP	C-15T	S531L	K43R	M306V	T359C
H247	H	IRESP	C-15T	S531L	K43R	s/ mut	T2C
H88	H	IRESP	C-15T	S531L	K43R	s/ mut	T2C
BK86	Q	IRSP	C-15T	S531L	K43R		T2C
BK235	T	IRSP	C-15T	S531L	K43R		T359C
BK236	T	IRESP	C-15T	S531L	K43R	M306V	T359C
BK373	S	IRESP	C-15T	S531L	K43R	s/ mut	nd
BK386	Q	IRSP	C-15T	S531L	K43R		T2C
BK409	A	IRESP	C-15T	D516V	K43R	s/ mut	250InsC
BK776	I	IRSP	C-15T	S531L	K43R	s/ mut	282InsT
BK800	T	IRESP	C-15T	S531L	K43R	M306V	T359C
BK802	T	IRESP	s/ mut	S531L	s/ mut	s/ mut	nd
BK1136	R	IRES	C-15T	S531L	nd	M306V	
BK451	G	IRSEP	C-15T	S531L	K43R	nd	nd
BK410	A	IRP	s/ mut	S531L			nd
BK7	S	IRS	C-15T	S531L	s/ mut		
BK761	A	IRS	C-15T	S531L	K43R		
BK137	S	IRS	C-15T	S531L	K43R		
BK62	F	IRES	C-15T	S531L	K43R	M306V	
BK413	T	IRSP	C-15T	S531L	nd		nd
BK11	B	IRESP	C-15T	S531L	K43R	M306V	nd

nd – não determinado

O *cluster* Lisboa3 é o cluster predominante, sendo composto por 23 isolados clínicos multirresistentes. Embora o *cluster* possa ser discriminado em várias estirpes, destacam-se as estirpes resistentes à pirazinamida com as mutações T2C e T359C no gene *pncA*. Estas estirpes adquiriram resistência a todos os antibacilares de primeira linha, tendo adquirido resistência ao etambutol em último lugar uma vez que existem estirpes com as referidas mutações que não são resistentes ao etambutol. As estirpes com a mutação T2C adquiriram resistência ao etambutol através da mutação M306V na proteína EmbB, ao passo que as estirpes com mutação T359C adquiriram resistência ao etambutol devido a uma mutação desconhecida neste caso. Em ambos os casos parece ter existido transmissão recente (Tabela 9).

Tabela 10 – Origem, perfil de resistência e mutações encontradas nos isolados do *cluster* Q1

Cluster Q1							
Isolado	Origem	Resistência	Mutações				
			<i>inhA</i>	RpoB	RpsL	EmbB	<i>pncA</i>
H268	H	IRESP	C-15T	S531L	s/ mut	M306V	T374G
H60	H	IRP	C-15T	S531L			T374G
BK515	I	IREP	C-15T	S531L		M306V	T374G
BK728	K	IRESP	C-15T	S531L	s/ mut	M306V	T374G
BK894	Q	IRESP	C-15T	S531L	nd	nd	nd
BK76	I	IRESP	C-15T	S531L	s/ mut	M306V	T374G
BK499	T	IRESP	C-15T	S531L	s/ mut	M306V	nd
BK372	E	IRSP	C-15T	S531L	nd		T374G
BK284	I	IRESP	C-15T	S531L	s/ mut	M306V	T374G
BK768	E	IRSP	C-15T	S531L	s/ mut		T374G
H59	H	IRESP	C-15T	S531L	s/ mut	M306V	T374G

nd – não determinado

O *cluster* Q1 é composto por 11 isolados multirresistentes, todos resistentes à pirazinamida. Tratam-se de estirpes que muito provavelmente adquiriram resistência à estreptomicina (através de um acontecimento mutacional desconhecido) e ao etambutol só após terem adquirido resistência à pirazinamida. É ainda um cluster que tem vindo a apresentar uma predominância crescente ao longo do tempo (Perdigão e colaboradores, 2008). Salienta-se ainda o facto de os isolados BK515, BK76 e BK284 terem origem na mesma instituição de saúde, um hospital prisional, e poderem por essa razão serem exemplificativos de casos de transmissão nosocomial. O isolado BK515 será provavelmente ancestral relativamente aos outros dois isolados e, representa uma estirpe que provavelmente após transmissão adquiriu resistência à estreptomicina, tendo-se mais tarde disseminado na comunidade (Tabela 10).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objectivo a caracterização genética de 94 isolados clínicos resistentes a um ou mais antibióticos de primeira linha, provenientes da Região de Saúde de Lisboa. A caracterização genética foi realizada através da genotipagem de cada isolado, pela técnica de MIRU-VNTR, e pela caracterização das mutações que estão a conferir resistência em cada um dos isolados. Esta caracterização genética é fundamental para se conhecer a prevalência de estirpes específicas, a sua transmissibilidade e o modo como adquirem resistência aos diferentes antibióticos.

Em 2004, a Direcção Geral de Saúde relatou a existência de apenas 22 casos com multirresistência para todo o território nacional (EuroTB, 2006). No entanto, os 94 isolados aqui estudados são um subconjunto de 214 isolados clínicos resistentes recebidos da Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo no mesmo ano. Desses 214 isolados clínicos, 76 eram multirresistentes. Tamanha discrepância poderá ser explicada por uma elevada subnotificação dos casos resistentes à Direcção Geral de Saúde. Apesar de a tuberculose ser uma doença de notificação obrigatória, tal poderá dever-se à comunicação do caso após confirmação laboratorial mas não da resistência, visto tratar-se de um resultado posterior ao primeiro. Enquanto esta situação se verificar, será difícil avaliar a predominância e a tomada de medidas para reduzir a prevalência de casos de multirresistência, tanto primária como adquirida.

Para melhor compreender a forma como *M. tuberculosis* se transmite e adquire resistência aos antibióticos na comunidade, foram ainda caracterizadas as mutações associadas à resistência à isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol e pirazinamida. No que diz respeito às mutações associadas à resistência à isoniazida verificou-se que, contrariamente a estudos anteriores noutros países (Coll e colaboradores, 2005; Nikolayevsky e colaboradores, 2004; Silva e colaboradores, 2003; Bakonyte e colaboradores, 2003; Sajduda e colaboradores, 2004; Zhang e colaboradores, 2005; Rindi e colaboradores, 2005; Lee e colaboradores, 1999), a mutação mais prevalente ocorreu não no gene *katG*, mas na região promotora do operão *mabA-inhA*. A mutação C-15T na referida região, detectada em 44 (84,6%) isolados, tem sido considerada uma mutação hipermórfica, resultando num nível de expressão mais elevado da proteína *InhA* (Ramaswamy e colaboradores, 1998). A sobreexpressão de *inhA* tem também sido associada com a resistência à isoniazida (Larsen e colaboradores, 2002) e, mais recentemente Vilchéze e colaboradores (2006) determinaram o alvo primário da isoniazida como sendo a proteína *InhA*. No entanto, a sobreexpressão de *inhA* foi também associada à resistência à etionamida (Larsen e colaboradores, 2002), um análogo da isoniazida que partilha com esta parte do seu mecanismo de acção (Vilchéze e colaboradores, 2005). O facto de os isolados estudados apresentarem uma alta prevalência de uma mutação que causa a sobreexpressão de *inhA* poderá, por outro lado, explicar a elevada prevalência de resistência à etionamida nos isolados testados quanto à susceptibilidade aos antibióticos de segunda linha. Bakonyte e colaboradores (2003) associaram mutações no gene *katG* com a presença de resistência a outros antibióticos ou à multirresistência, visto que estas mutações eram mais prevalentes em isolados com resistência múltipla. Os resultados aqui apresentados são contrários a essa observação dado que dos isolados multirresistentes estudados só 6 em 23 isolados testados, é que apresentaram mutações no gene *katG*.

Foram detectadas mutações na região determinante da resistência à rifampicina em 42 (97,7%) isolados, enquanto o isolado restante não apresentou qualquer mutação na referida região. Tal, está de acordo com resultados de estudos prévios (Williams e colaboradores, 1994; Kapur e colaboradores, 1994). A mutação S531L foi detectada em 38 (88,4%) isolados, sendo a mutação mais prevalente associada à resistência à rifampicina. Esta taxa de prevalência é significativamente mais alta do que as taxas de prevalência já relatadas em estudos anteriores, nos quais variaram entre 29-57%, envolvendo quer isolados clínicos (Williams e colaboradores, 1994; Kapur e colaboradores, 1994; Ma e colaboradores, 2006), quer mutantes gerados *in vitro* (Huitric e colaboradores, 2006). Contudo, a elevada prevalência da mutação S531L não pode ser explicada como se tratando de um carácter ancestral visto que, isolados que apresentam esta mutação provêm de diversos *clusters* genéticos, que não estão exclusivamente associados com multirresistência e, porque podem existir no mesmo *cluster* outras mutações que não a S531L. Os resultados acima descritos podem indicar a existência de uma predisposição genética para a aquisição desta mutação específica, que confere resistência à rifampicina, entre a superfamília genética de isolados que circulam na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo.

Foram pesquisadas mutações no gene *rpsL* em isolados resistentes à estreptomicina. Foram somente encontradas duas mutações diferentes, a mutação K43R e K88R em 39 (48,8%) e 1 (1,1%) isolados, respectivamente. Ambas as mutações tinham já sido previamente associadas à resistência à estreptomicina (Fukuda e colaboradores, 1999; Sreevatsan e colaboradores, 1996; Meier e colaboradores, 1994; Meier e colaboradores, 1996). Os restantes isolados não apresentaram quaisquer mutações no gene *rpsL*. O fenótipo de resistência nestes isolados poderá ser devido à já relatada ocorrência de alterações na permeabilidade ao antibacilar (Meier e colaboradores, 1996). Outro factor que poderá influenciar este resultado estará relacionado com a concentração crítica utilizada no teste de susceptibilidade aos antibacilares. Esta concentração, apesar de ser a recomendada, poderá ser demasiado baixa resultando na atribuição da classificação fenotípica de resistentes a estirpes com um reduzido nível de resistência. Para 10 dos isolados que não apresentaram mutações no gene *rpsL*, pesquisou-se a região compreendida entre os nucleótidos 10 e 1037 do gene *rrs*, porém, não foram encontradas mutações nessa região.

No que diz respeito à base molecular da resistência ao etambutol, foi examinada uma região com 513 pb do gene *embB*. Mutações no gene *embB* têm sido associadas à resistência ao etambutol, nomeadamente numa região designada por região determinante da resistência ao etambutol e que é abrangida pelo fragmento analisado. Verificou-se que 48,2% dos isolados resistentes ao etambutol apresentaram mutações na região estudada,

sendo que 44,8% apresentavam a mesma mutação na posição 306 (a substituição da metionina por uma valina). A associação de mutações no codão 306 do gene *embB* com a resistência ao etambutol tem sido posta em causa nos últimos anos. Num estudo efectuado, Parsons e colaboradores (2005) verificaram que mutações no codão 306 aparecem geralmente associadas a um elevado nível de resistência ao etambutol; num outro estudo realizado por Johnson e colaboradores (2006), verificou-se não existirem mutações no codão 306 em 117 isolados susceptíveis, o que reforçaria a hipótese de mutações no codão 306 conferirem resistência ao etambutol. Porém, vários autores verificaram existir uma forte presença de mutações no codão 306 em isolados resistentes ao etambutol, mas também a existência de mutações no codão 306 em isolados susceptíveis ao etambutol (Lee e colaboradores, 2004; Sugawara e colaboradores, 2005; Hazbón e colaboradores, 2005; Shi e colaboradores, 2007).

Hazbón e colaboradores (2005) propuseram a hipótese de que mutações no codão 306 não conferem resistência ao etambutol, uma vez que foram encontradas em isolados susceptíveis ao etambutol, alguns dos quais com concentrações mínimas inibitórias (CMI) bastante baixas (< 2,5 µg/ml). No entanto, estes autores propõem que estas mutações poderiam ser utilizadas como marcadores de multirresistência, uma vez que a probabilidade da presença de mutações no codão 306 aumenta à medida que aumenta a resistência a um maior número de antibióticos, o que implicaria que raramente se observe mutações no codão 306 em isolados monorresistentes ao etambutol.

Posteriormente, Plinke e colaboradores (2006) obtiveram resultados que contradizem a existência de mutações no codão 306 unicamente em isolados multirresistentes, encontrando mutações no codão 306 tanto em isolados multirresistentes como em isolados não-multirresistentes. Neste estudo, só foram encontradas mutações no codão 306 do gene *embB* em isolados multirresistentes. No entanto, tal poderá ter ocorrido porque a grande maioria dos isolados resistentes ao etambutol era também multirresistente.

Recentemente, Shi e colaboradores (2007) relataram uma falta de correlação entre mutações no gene *embB* e a CMI para o etambutol. O papel das mutações no codão 306 do gene *embB* permanece pouco claro, sendo necessários mais estudos para resolver esta questão.

Alterações genéticas que conferem resistência à pirazinamida ocorrem na sua maioria no gene *pncA*, cujo produto génico é a pirazinamidase/nicotinamidase. Embora existam relatos de isolados clínicos resistentes à pirazinamida com uma sequência selvagem para o gene *pncA*, nenhum outro mecanismo de resistência é conhecido (Rodrigues e colaboradores, 2005; Portugal e colaboradores, 2004; Morlock e colaboradores, 2000; Cheng e colaboradores, 2000). Cinco (15,6%) dos isolados resistentes à pirazinamida aqui

testados não apresentaram nenhuma mutação quer no gene *pncA*, quer na região reguladora. No entanto, o teste de susceptibilidade aos antibacilares de primeira linha para quatro dos referidos isolados foi realizado na instituição de saúde que os enviou. Dois foram enviados como monorresistentes à pirazinamida e os restantes como resistentes à pirazinamida e estreptomicina. Os quatro isolados perderam viabilidade para se realizar novamente o teste de susceptibilidade à pirazinamida. No entanto, outros dois isolados enviados pela mesma instituição no mesmo ano como resistentes à pirazinamida puderam ser testados e mostraram ser susceptíveis, tendo um sido eliminado do presente estudo por ser susceptível a todos os antibacilares de primeira linha. O isolado restante foi considerado monorresistentes à isoniazida e permaneceu no estudo. Pode assim ser levantada a suspeita de que os quatro isolados resistentes à pirazinamida sem mutações no gene *pncA* sejam de facto susceptíveis. O outro isolado resistente à pirazinamida foi testado no INSA e é resistente a todos os antibacilares de primeira linha excepto à rifampicina, e portanto não levanta suspeitas quanto ao perfil de resistência. Além da ausência de mutações, foram detectadas quatro mutações *missense*, duas mutações *frameshift*, uma deleção aminoacídica e uma mutação na região promotora do gene. A deleção aminoacídica (mutação 412Del3pb) nunca havia sido descrita, tratando-se pois de uma nova mutação associada à resistência à pirazinamida.

A diversidade mutacional associada à resistência à pirazinamida é única neste antibacilar e tal poderá estar relacionado com o facto de o gene *pncA* não ser essencial para a viabilidade celular (Cheng e colaboradores, 2000); é por isso esperado que uma restringência mutacional menor resulte numa grande diversidade mutacional. Apesar da existência de uma grande variedade mutacional, vários autores (Scorpio e colaboradores, 1997; Lemaitre e colaboradores, 1999; Rodrigues e colaboradores, 2005) verificaram haver um certo grau de *clustering* mutacional em redor de três regiões do gene *pncA*: codões 3 a 17, 61 a 85 e, 132 a 142. Das mutações obtidas no presente estudo só três, representadas por 4 (14,8%) isolados, é que estão localizadas nas referidas regiões. Lemaitre e colaboradores (1999) através de um estudo de genómica comparativa sugeriram que estas regiões poderão ser cataliticamente importantes. Assim, a maioria das mutações encontradas poderão somente afectar a estrutura conformacional da proteína.

Apesar de existirem vários métodos moleculares comerciais para a detecção da resistência, a predominância das mutações associadas à resistência varia geograficamente. O conhecimento da prevalência destas mutações poderá por essa razão permitir o desenvolvimento de novos métodos, localmente adaptados a uma detecção precoce da resistência, bem como estudar a viabilidade da introdução de um método comercial nesse mesmo diagnóstico. Van Rie e colaboradores (2001), p.e., detectaram cerca de 90% de

todos os casos de multirresistência através da análise de três codões; vários métodos foram já empregues neste tipo de caracterização e detecção (Fukuda e colaboradores, 1999; Mieskes e colaboradores, 2000; Scorpio e colaboradores, 1997; Cooksey e colaboradores, 2002; Johnson e colaboradores, 2006; Jureen e colaboradores, 2006; Denkin e colaboradores, 2005; Aragón e colaboradores, 2006). O desenvolvimento de uma estratégia deste tipo, que permita detectar precocemente a maioria dos isolados clínicos resistentes na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, está já actualmente em desenvolvimento.

Outra aplicação do conhecimento das mutações responsáveis pela resistência aos antibacilares em cada isolado está relacionada com o estudo epidemiológico dos mesmos. As mutações referidas podem ser utilizadas como marcadores genéticos ao se analisar epidemiologicamente uma dada população de casos do ponto de vista molecular. A discriminação de *clusters* genéticos de isolados clínicos foi já relatada em estudos anteriores tendo permitido a sua diferenciação em surtos independentes (Portugal e colaboradores, 1999a; Sajduda e colaboradores, 2004). Todos os isolados clínicos foram genotipados pela técnica de MIRU-VNTR, tendo sido realizada uma análise mutacional dos *clusters* genéticos identificados. A análise mutacional permitiu estabelecer uma ordem provável de aquisição de resistência aos vários antibacilares. Verificou-se que na maioria dos casos, a resistência à estreptomicina foi a primeira a ser adquirida, seguida de aquisição de resistência à isoniazida e depois rifampicina. A resistência à pirazinamida e ao etambutol são aparentemente as últimas a ser adquiridas. No caso específico de alguns isolados do *cluster* Lisboa3 a resistência à pirazinamida parece ter sido adquirida anteriormente à resistência ao etambutol. Outro *cluster* que se destacou nesta análise foi o *cluster* Q1, não pertencente à família Lisboa, mas que todavia tem vindo a apresentar uma maior prevalência ao longo do tempo (Perdigão e colaboradores, 2008). Trata-se de um *cluster* bastante homogéneo, o que poderá reflectir casos de transmissão recente, havendo isolados com origem no mesmo Hospital Prisional, podendo também por essa razão tratarem-se de casos de transmissão nosocomial.

Comparando com estudos anteriores realizados na região (Portugal e colaboradores, 1999a; Portugal e colaboradores, 1999b), pôde-se verificar que o *cluster* Lisboa3 permanece como o *cluster* mais prevalente na região. Tal, indica que estas estirpes nunca foram eficazmente contidas, continuando a causar mais casos de tuberculose multirresistente na comunidade, e nesta fase, provavelmente pelo país.

Foi verificado que alguns dos *clusters* observados podiam ser subdivididos em *clusters* menores, compostos por isolados com perfil mutacional idêntico. A combinação da genotipagem, por MIRU-VNTR, com uma análise mutacional permitiu a discriminação do

que seria considerado um surto ou uma série de possíveis transmissões em surtos menores. Recentemente, um novo conjunto de MIRUs foi proposto para padronização da técnica de MIRU-VNTR (Supply e colaboradores, 2006). Este novo ajuste poderá elevar o poder discriminatório desta técnica até ao nível, ou mesmo acima, da de RFLP-IS6110.

Um outro aspecto averiguado no decorrer do estudo foi a prevalência de isolados com resistência extensiva entre os isolados multirresistentes analisados. A prevalência de isolados com XDR-TB encontrada neste estudo foi de 48,7%. Estudos realizados com isolados clínicos de outros países mostraram prevalências de XDR (na altura ainda considerando a primeira definição adoptada, de multirresistência acrescida de resistência a pelo menos três classes de antibacilares de segunda linha) de 10,9%, 19%, 15% e 4% entre isolados multirresistentes no Irão, Letónia, Coreia do Sul e estados Unidos da América respectivamente (CDC, 2006; Masjedi, 2006). Tendo em conta a definição anterior, a prevalência de isolados com resistência extensiva neste estudo seria de 53,8%. Outro estudo realizado por Shah e colaboradores (2007) envolvendo isolados, entre 2000-2004, em 14 laboratórios de referência supranacionais mostrou que no conjunto os países industrializados apresentavam uma taxa de XDR-TB de 6,5% (definição antiga). No global esse mesmo estudo mostrou que 6,6% dos isolados eram XDR de acordo com a definição recente revista pela Global XDR-TB Task Force (WHO, 2006). Verifica-se portanto existir na região uma elevada taxa de XDR-TB, provavelmente devido ao facto de estarem em circulação estirpes multirresistentes já identificadas há mais de 10 anos (Portugal e colaboradores, 1999b). A circulação contínua destas estirpes na comunidade tem-lhes permitido uma aquisição progressiva de resistência a antibacilares de segunda linha. Outro factor que poderá explicar e estar a contribuir para as elevadas taxas de XDR na região está relacionado com a elevada taxa de prescrição de fluoroquinolonas na quimioterapêutica de outras infecções. Portugal é o país da UE com a taxa de prescrição de fluoroquinolonas mais elevada, cerca de 3,10 DID (dose diária definida por 1000 habitantes por dia) (Ferech e colaboradores, 2006). Esta elevada taxa de prescrição de fluoroquinolonas poderá ser parcialmente responsável pela elevada taxa de XDR devido à selecção de estirpes resistentes de *M. tuberculosis* aquando do tratamento de outras infecções. Os casos de XDR-TB estão associados a uma elevada taxa de insucesso terapêutico e consequente mortalidade. Na África do Sul, 52 de 53 doentes com tuberculose XDR sobreviveram em média 16 dias após o diagnóstico (Gandhi e colaboradores, 2006).

A presença de estirpes de *M. tuberculosis* com XDR apresenta-se como um sério problema de saúde pública na região, tratando-se de uma situação que requer medidas urgentes de modo a ser travada.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objectivos principais a genotipagem e caracterização molecular da resistência de isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais antibacilares.

Foram determinadas quais as mutações mais prevalentes associadas à resistência aos antibacilares e que se verificou serem: a mutação C-15T, no operão *mabA-inhA*, para a isoniazida; S531L na subunidade β da RNA polimerase, para a rifampicina; K43R na proteína ribossomal S12, para a estreptomicina; M306V na arabinosil transferase EmbB, para o etambutol; e T359C e T374G no gene *pncA*, para a pirazinamida. Foi também avaliada a proximidade genética dos isolados estudados.

Concluindo, os casos de tuberculose multirresistente na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo são devidos estirpes de *M. tuberculosis* pertencentes na sua maioria a uma família de vários *clusters*, *clusters* esses identificados há vários anos atrás e já na altura relacionados com multirresistência. A não contenção destas estirpes irá resultar num crescente número de casos de tuberculose multirresistente à medida que se disseminam pela comunidade local, hospitais ou mesmo pelo país. O desenvolvimento de um método de detecção molecular localmente adaptado é necessário com vista à implementação de um plano eficaz de detecção da multirresistência. Tal, vai permitir uma detecção rápida e atempada, prevenindo um aumento, das já elevadas taxas de XDR-TB. O estudo aqui presente contribui não só com o conhecimento acerca da situação actual, mas também com um primeiro passo na criação de uma tal estratégia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Aragón, L. M., F. Navarro, V. Heiser, M. Garrigo, M. Espanol, and P. Coll.** 2006. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. *J Antimicrob Chemother* **57**:825-831.
- **Bakonyte, D., A. Baranauskaite, J. Civenaite, A. Sosnovskaja, and P. Stakenas.** 2003. Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Lithuania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**:2009-2011.
- **Barnes, P. F., and M. D. Cave.** 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* **349**:1149-56.
- **Blackwood, K. S., J. N. Wolfe, and A. M. Kabani.** 2004. Application of *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing* to Manitoba Tuberculosis Cases: Can Restriction

Fragment Length Polymorphism Be Forgotten? *Journal of Clinical Microbiology* **42**:5001-5006.

- **Cardoso, R. F., R. C. Cooksey, G. P. Morlock, P. Barco, L. Cecon, F. Forestiero, C. Q. F. Leite, D. N. Sato, M. L. Shikama, and E. M. Mamizuka.** 2004. Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**:3373-3381.
- **CDC.** 2006. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs Worldwide, 2000-2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **55**:301-305.
- **Cheng, S. J., L. Thibert, T. Sanchez, L. Heifets, and Y. Zhang.** 2000. *pncA* Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Spread of a Monoresistant Strain in Quebec, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**:528-532.
- **Coll, P.** 2003. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **21**:299-308.
- **Coll, P., L. M. Aragon, F. Alcaide, M. Espasa, M. Garrigo, J. Gonzalez, J. M. Manterola, P. Orus, and M. Salvado.** 2005. Molecular Analysis of Isoniazid and Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Recovered from Barcelona. *Microbial Drug Resistance* **11**:107-114.
- **Cooksey, R. C., G. P. Morlock, B. P. Holloway, J. Limor, and M. Hepburn.** 2002. Temperature-Mediated Heteroduplex Analysis Performed by Using Denaturing High-Performance Liquid Chromatography To Identify Sequence Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **40**:1610-1616.
- **Denkin, S., D. Volokhov, V. Chizhikov, and Y. Zhang.** 2005. Microarray-based *pncA* genotyping of pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medical Microbiology* **54**:1127-1131.
- **DGS.** 2007. Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose, Ponto da Situação Epidemiológica, Ano de 2005. Direção Geral de Saúde, Divisão de Doenças Transmissíveis.
- **EuroTB.** 2006. Surveillance of Tuberculosis in Europe, Report on Tuberculosis cases notified in 2004. Institut de Veille Sanitaire.
- **Ferech, M., S. Coenen, S. Malhotra-Kumar, K. Dvorakova, E. Hendrickx, C. Suetens, and H. Goossens.** 2006. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient quinolone use in Europe. *J Antimicrob Chemother* **58**:423-427.
- **Fukuda, M., H. Koga, H. Ohno, B. Yang, Y. Hirakata, S. Maesaki, K. Tomono, T. Tashiro, and S. Kohno.** 1999. Relationship between genetic alteration of the *rpsL* gene and streptomycin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**:281-284.
- **Gandhi, N. R., A. Moll, A. W. Sturm, R. Pawinski, T. Govender, U. Lalloo, K. Zeller, J. Andrews, and G. Friedland.** 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *The Lancet* **368**:1575-1580.
- **Hannan, M. M., E. P. Desmond, G. P. Morlock, G. H. Mazurek, and J. T. Crawford.** 2001. Pyrazinamide-Monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:647-650.

- **Hazbon, M. H., M. Bobadilla del Valle, M. I. Guerrero, M. Varma-Basil, I. Filliol, M. Cavatore, R. Colangeli, H. Safi, H. Billman-Jacobe, C. Lavender, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, A. Davidow, M. Brimacombe, C. I. Leon, T. Porras, M. Bose, F. Chaves, K. D. Eisenach, J. Sifuentes-Osornio, A. Ponce de Leon, M. D. Cave, and D. Alland.** 2005. Role of embB Codon 306 Mutations in Mycobacterium tuberculosis Revisited: a Novel Association with Broad Drug Resistance and IS6110 Clustering Rather than Ethambutol Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3794-3802.
- **Huitric, E., J. Werngren, P. Juréen, and S. Hoffner.** 2006. Resistance Levels and rpoB Gene Mutations among In Vitro-Selected Rifampin-Resistant Mycobacterium tuberculosis Mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**:2860-2862.
- **Johnson, R., A. M. Jordaan, L. Pretorius, E. Engelke, G. van der Spuy, C. Kewley, M. Bosman, P. D. van Helden, R. Warren, and T. C. Victor.** 2006. Ethambutol resistance testing by mutation detection. *INT J TUBERC LUNG DIS* **10**:68-73.
- **Jureen, P., L. Engstrand, S. Eriksson, A. Alderborn, M. Krabbe, and S. E. Hoffner.** 2006. Rapid Detection of Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis by Pyrosequencing Technology. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:1925-1929.
- **Kapur, V., L. L. Li, S. Iordanescu, M. R. Hamrick, A. Wanger, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from New York City and Texas. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:1095-1098.
- **Larsen, M. H., C. Vilcheze, L. Kremer, G. S. Besra, L. Parsons, M. Salfinger, L. Heifets, M. H. Hazbon, D. Alland, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs Jr.** 2002. Overexpression of inhA, but not kasA, confers resistance to isoniazid and ethionamide in Mycobacterium smegmatis, M. bovis BCG and M. tuberculosis. *Molecular Microbiology* **46**:453-466.
- **Lee, A. S. G., I. H. K. Lim, L. L. H. Tang, A. Telenti, and S. Y. Wong.** 1999. Contribution of kasA Analysis to Detection of Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis in Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**:2087-2089.
- **Lee, A. S. G., S. N. K. Othman, Y. M. Ho, and S. Y. Wong.** 2004. Novel Mutations within the embB Gene in Ethambutol-Susceptible Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**.
- **Lemaitre, N., W. Sougakoff, C. Truffot-Pernot, and V. Jarlier.** 1999. Characterization of New Mutations in Pyrazinamide-Resistant Strains of Mycobacterium tuberculosis and Identification of Conserved Regions Important for the Catalytic Activity of the Pyrazinamidase PncA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**:1761-1763.
- **Ma, X., H. Wang, Y. Deng, Z. Liu, Y. Xu, X. Pan, J. M. Musser, and E. A. Graviss.** 2006. rpoB Gene Mutations and Molecular Characterization of Rifampin-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from Shandong Province, China. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:3409-3412.
- **Masjedi, M. R., P. Farnia, S. Sorooch, M. V. Pooramiri, S. D. Mansoori, A. Z. Zarifi, A. Akbarvelayati, and S. Hoffner.** 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis: 2 years of surveillance in Iran. *Clin Infect Dis* **43**:841-7.
- **Meier, A., P. Kirschner, F. C. Bange, U. Vogel, and E. C. Bottger.** 1994. Genetic alterations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis: mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**:228-233.
- **Meier, A., P. Sander, K. J. Schaper, M. Scholz, and E. C. Bottger.** 1996. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-

resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**:2452-2454.

- **Mestdagh, M., P. A. Fonteyne, L. Realini, R. Rossau, G. Jannes, W. Mijs, K. A. L. De Smet, F. Portaels, and E. Van den Eeckhout.** 1999. Relationship between Pyrazinamide Resistance, Loss of Pyrazinamidase Activity, and Mutations in the *pncA* Locus in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**:2317-2319.
- **Mieskes, K. T., S. Rusch-Gerdes, C. Truffot-Pernot, K. Feldmann, E. Tortoli, M. Casal, T. Loscher, and H. Rinder.** 2000. Rapid, simple, and culture-independent detection of *rpsL* codon 43 mutations that are highly predictive of streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **63**:56-60.
- **Morlock, G. P., J. T. Crawford, W. R. Butler, S. E. Brim, D. Sikes, G. H. Mazurek, C. L. Woodley, and R. C. Cooksey.** 2000. Phenotypic Characterization of *pncA* Mutants of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**:2291-2295 .
- **Narayanan, S.** 2004. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Indian J Med Res* **120**:233-47.
- **Nikolayevsky, V., T. Brown, Y. Balabanova, M. Ruddy, I. Fedorin, and F. Drobniowski.** 2004. Detection of Mutations Associated with Isoniazid and Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis Isolates from Samara Region, Russian Federation. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:4498-4502.
- **Parsons, L. M., M. Salfinger, A. Clobridge, J. Dormandy, L. Mirabello, V. L. Polletta, A. Sanic, O. Sinyavskiy, S. C. Larsen, and J. Driscoll.** 2005. Phenotypic and Molecular Characterization of Mycobacterium tuberculosis Isolates Resistant to both Isoniazid and Ethambutol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**:2218-2225.
- **Perdigão, J., R. Macedo, I. João, E. Fernandes, L. Brum, and I. Portugal.** 2008. Multidrug-Resistant Tuberculosis in Lisbon, Portugal: A Molecular Epidemiological Perspective. *Microbial Drug Resistance* **14** *in press*.
- **Persing, D. H.** 1996. PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases: A Supplement to Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. American Society Microbiology.
- **Plinke, C., S. Rusch-Gerdes, and S. Niemann.** 2006. Significance of Mutations in *embB* Codon 306 for Prediction of Ethambutol Resistance in Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1900-2.
- **Portugal, I., L. Barreiro, J. Moniz-Pereira, and L. Brum.** 2004. *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**:2736-2738.
- **Portugal, I., S. Maia, and J. Moniz-Pereira.** 1999. Discrimination of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis IS6110 Fingerprint Subclusters by *rpoB* Gene Mutation Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **37**:3022-3024.
- **Portugal, I., M. J. Covas, L. Brum, M. Viveiros, P. Ferrinho, J. Moniz-Pereira, and H. David.** 1999. Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* **3**:207-13.
- **Ramaswamy, S., and J. M. Musser.** 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. *Tuber Lung Dis* **79**:3-29.

- **Rindi, L., L. Bianchi, E. Tortoli, N. Lari, D. Bonanni, and C. Garzelli.** 2005. Mutations responsible for *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid resistance in Italy. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **9**:94-97.
- **Rodrigues, V. F. S., M. A. Telles, M. O. Ribeiro, P. I. Cafrune, M. L. R. Rossetti, and A. Zaha.** 2005. Characterization of *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**:444-446.
- **Rossetti, M. L. R., A. R. de Moura Valim, M. S. N. Silva, and V. S. Rodrigues.** 2002. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Rev Saúde Pública* **36**:525-32.
- **Sajduda, A., A. Brzostek, M. Poplawska, E. Augustynowicz-Kopec, Z. Zwolska, S. Niemann, J. Dziadek, and D. Hillemann.** 2003. Molecular Characterization of Rifampin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Poland. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:2425-2431.
- **Scorpio, A., P. Lindholm-Levy, L. Heifets, R. Gilman, S. Siddiqi, M. Cynamon, and Y. Zhang.** 1997. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**:540-543.
- **Scorpio, A., and Y. Zhang.** 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine* **2**:662-667.
- **Shah, N. S., A. Wright, G. H. Bai, L. Barrera, F. Boulahbal, N. Martín-Casabona, F. Drobniewski, C. Gilpin, M. Havelková, and R. Lepe.** 2007. Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis* **13**:380-7.
- **Shi, R., J. Zhang, K. Otomo, G. Zhang, and I. Sugawara.** 2007. Lack of Correlation between *embB* Mutation and Ethambutol MIC in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**:4515-4517.
- **Silva, M. S. N., S. G. Senna, M. O. Ribeiro, A. R. M. Valim, M. A. Telles, A. Kritski, G. P. Morlock, R. C. Cooksey, A. Zaha, and M. L. R. Rossetti.** 2003. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* Genes of Brazilian Isoniazid-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **41**:4471-4474.
- **Somoskovi, A., L. M. Parsons, and M. Salfinger.** 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* **2**:164-8.
- **Sreevatsan, S., X. Pan, K. E. Stockbauer, D. L. Williams, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 1996. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**:1024-1026.
- **Sugawara, I., K. Otomo, H. Yamada, G. Wang, C. Du, R. Shi, and G. Zhang.** 2005. The Molecular Epidemiology of Ethambutol-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Henan Province, China. *Japanese journal of infectious diseases* **58**:393-395.
- **Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, and S. Roring.** 2006. Proposal for standardization of optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:4498-4510.
- **Supply, P., S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, and C. Locht.** 2001. Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:4175-4180.

- **Uhl, J. R., G. S. Sandhu, B. C. Kline, and F. R. Cockerill III.** 1996. PCR-RFLP detection of point mutations in the catalase-peroxidase gene (*katG*) of *Mycobacterium tuberculosis* associated with isoniazid resistance. *PCR protocols for emerging infectious disease*. ASM Press, Washington, DC:144–149.
- **Van Rie, A., R. Warren, I. Mshanga, A. M. Jordaan, G. D. van der Spuy, M. Richardson, J. Simpson, R. P. Gie, D. A. Enarson, and N. Beyers.** 2001. Analysis for a Limited Number of Gene Codons Can Predict Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a High-Incidence Community. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:636-641.
- **Vilchèze, C., F. Wang, M. Arai, M. H. Hazbón, R. Colangeli, L. Kremer, T. R. Weisbrod, D. Alland, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs Jr.** 2006. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat Med* **12**:1027-1029.
- **Vilcheze, C., T. R. Weisbrod, B. Chen, L. Kremer, M. H. Hazbon, F. Wang, D. Alland, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs.** 2005. Altered NADH/NAD⁺ Ratio Mediates Coresistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacteria*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**:708-720.
- **WHO.** 2007. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. World Health Organization.
- **WHO.** 2006. Extensive drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control. *Weekly Epidemiological Record* **81**:430-32.
- **Williams, D. L., C. Waguespack, K. Eisenach, J. T. Crawford, F. Portaels, M. Salfinger, C. M. Nolan, C. Abe, V. Sticht-Groh, and T. P. Gillis.** 1994. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**:2380-2386.
- **Zhang, M., J. Yue, Y. Yang, H. Zhang, J. Lei, R. Jin, X. Zhang, and H. Wang.** 2005. Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:5477-5482.
- **Zhang, Y., and D. Mitchison.** 2003. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *INT J TUBERC LUNG DIS* **7**:6-21.