



Agilizando o diagnóstico da tuberculose multirresistente em uma região endêmica com o uso de um teste comercial de sondas em linha

Angela Pires Brandao^{1,2,a}, Juliana Maira Watanabe Pinhata^{1,b},
Rosângela Siqueira Oliveira^{1,c}, Vera Maria Neder Galesi^{3,d},
Helio Hehl Caiiffa-Filho^{1,e}, Lucilaine Ferrazoli^{1,f}

1. Instituto Adolfo Lutz – São Paulo (SP) Brasil.
 2. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (RJ) Brasil
 3. Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.
- a. <http://orcid.org/0000-0002-6036-9139>
b. <http://orcid.org/0000-0001-5758-6688>
c. <http://orcid.org/0000-0002-5188-8367>
d. <http://orcid.org/0000-0001-6325-4815>
e. <http://orcid.org/0000-0001-6048-4527>
f. <http://orcid.org/0000-0002-5389-7056>

Submetido: 19 de abril de 2018.
Aceito: 12 de agosto de 2018.

Trabalho realizado no Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses, Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (SP) Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o diagnóstico rápido de tuberculose multirresistente, utilizando um teste comercial de sondas em linha (LPA-*plus*), na rotina de um laboratório de referência de tuberculose. **Métodos:** O teste LPA-*plus* foi avaliado prospectivamente em 341 isolados simultaneamente submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos em meio líquido, pelo sistema automatizado. **Resultados:** Entre os 303 resultados fenotipicamente válidos, nenhum foi genotipicamente falso suscetível à rifampicina (13/13; 100% de sensibilidade). Dois isolados sensíveis à rifampicina apresentavam mutações no gene *rpoB* (288/290; especificidade de 99,3%), as quais, no entanto, não são associadas à resistência a rifampicina. O LPA-*plus* não identificou resistência à isoniazida em três isolados fenotipicamente resistentes (23/26; 88,5% de sensibilidade) e detectou todos os isolados sensíveis à isoniazida (277/277; especificidade de 100%). Entre os 38 (11%) resultados fenotípicos inválidos, o LPA-*plus* identificou 31 isolados sensíveis à rifampicina e à isoniazida, um resistente à isoniazida e seis como micobactérias não tuberculosas. **Conclusões:** O LPA-*plus* mostrou excelente concordância ($\geq 91\%$) e acurácia ($\geq 99\%$). Sua implementação pode acelerar o diagnóstico da tuberculose multirresistente, produzir número significativamente maior de resultados válidos do que o teste fenotípico de suscetibilidade aos antimicrobianos e fornecer informações adicionais sobre o nível de resistência aos fármacos.

Palavras-chave: Tuberculose resistente a múltiplos medicamentos; Técnicas de diagnóstico molecular; Testes de sensibilidade microbiana; *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUÇÃO

Um grande desafio para o controle efetivo da tuberculose (TB) em todo o mundo é a ocorrência de cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) mostrando resistência tanto à rifampicina (RIF) quanto à isoniazida (INH), os dois medicamentos de primeira linha mais efetivos no tratamento da TB.⁽¹⁾ Esse perfil de resistência, denominado "TB multirresistente" (TBMR), leva a regimes de medicamentos menos eficientes,⁽¹⁾ e está associado a falhas no tratamento, recidivas e resultados clínicos desfavoráveis.⁽²⁾

Em razão do aumento da TBMR, foram desenvolvidos novos testes diagnósticos mais rápidos e precisos que permitem o início de um tratamento precoce e mais eficaz, reduzindo a transmissão da TB resistente a medicamentos.^(3,4) Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) endossou o uso de ensaios moleculares para a triagem da TBMR.⁽⁵⁾ Um deles, o GenoType MTBDR*plus* (Hain Lifescience, Nehren, Alemanha), é um ensaio de sonda em linha que detecta MTBC, bem como mutações

e sequências do tipo selvagem na região determinante de resistência a rifampicina de 81 pares de bases do gene *rpoB*, no códon 315 do gene *katG*, e na região promotora do gene *inhA*.⁽⁶⁾ Assim, o MTBDR*plus* prevê TBMR por meio da detecção de resistência tanto à RIF (gene *rpoB*) como também à INH (genes *katG* e *inhA*). Embora a resistência à RIF tenha sido considerada um marcador da TBMR,^(4,7) identificar a resistência à INH pode ser útil, principalmente em regiões com alta carga de TB, nas quais a prevalência de TBMR é baixa,⁽⁴⁾ como no Brasil, onde 1,5 e 8,0% dos 82.676 casos de TB notificados em 2016 foram estimados como TBMR primária e adquirida, respectivamente.⁽⁸⁾

O MTBDR*plus* demonstrou boa precisão e agora é usado rotineiramente em muitos países,⁽⁴⁾ acelerando o diagnóstico de TBMR e reduzindo a demanda laboratorial por testes convencionais de suscetibilidade a medicamentos (TSM). No entanto, nenhum estudo utilizando este teste aplicado a isolados no fluxo de trabalho de diagnóstico de um laboratório de referência foi realizado até o momento no Brasil.

Correspondência:

Angela Pires Brandao. Instituto Adolfo Lutz, Avenida Doutor Arnaldo, 351, 9º andar, Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses, Centro de Bacteriologia, CEP: 01248-000, São Paulo, SP, Brasil
Tel.: 55 11 3068-2986. E-mail: abrandao1502@gmail.com

Suporte financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob o número 012/51756-5; A BioMérieux Brasil gentilmente forneceu gratuitamente três kits de GenoLyse e de GenoType MTBDR*plus* (Hain Lifescience GmbH).

Conflitos de interesse: os autores declaram não haver conflitos de interesse. A BioMérieux Brasil não desempenhou nenhum papel em nenhum aspecto do estudo ou na aprovação do manuscrito.

Nosso objetivo foi avaliar prospectivamente o desempenho do ensaio MTBDR_{plus} a partir de culturas do MTBC em comparação com TSM fenotípico em um laboratório de referência de TB de alto volume, bem como elucidar eventuais discrepâncias entre os dois métodos.

MÉTODOS

Local do estudo e população

Este estudo foi realizado no Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do Instituto Adolfo Lutz (IAL), uma instituição do governo do estado de São Paulo. O IAL é o laboratório de referência de TB e micobacterioses de São Paulo, responsável por 291 laboratórios em todo o estado, com diferentes infraestruturas para o processamento do material clínico coletado de pacientes ambulatoriais e internados, cobertos pelo sistema público de saúde. Esses laboratórios realizam baciloscopia de bacilos álcool-ácido resistentes ou o teste Xpert MTB/RIF (Cepheid, SUNV, CA, EUA) implementado em 36 deles a partir do final de 2014. Oitenta laboratórios dessa rede realizam culturas e enviam para o IAL, onde o TSM é realizado para pacientes com maior risco de TB resistente a medicamentos. Estes incluem quaisquer casos de baciloscopia positiva após 2 meses de tratamento da TB, aqueles que são contatos de pacientes TB-resistentes conhecidos, casos de TB de retratamento e quaisquer pessoas imunodeprimidas, usuários de álcool ou drogas ilícitas, profissionais de saúde, indivíduos sem moradia, indígenas, imigrantes, reclusos, internados e agentes penitenciários.⁽⁹⁾ Em 2016, essa estrutura laboratorial em São Paulo atendia virtualmente a uma população de 44,85 milhões de habitantes com uma taxa de incidência de 36,4 por 100.000.⁽¹⁰⁾ O IAL recebe por ano aproximadamente 7.000 culturas de micobactérias para confirmar a identificação e realiza o TSM de primeira linha em quase 4.000 isolados.

Para este estudo, um tamanho de amostra (n) de 307 casos de TB foi calculado usando a fórmula $n = Z^2 P(1-P)/d^2$ ⁽¹¹⁾ aplicada a uma frequência esperada de 15% (p = 0,15) de resistência a pelo menos um dos medicamentos anti-TB, RIF ou INH, e 95% de intervalo de confiança (IC 95%), com valor de Z de 1,96 e precisão de 4% (d = 0,04).

Dados demográficos e clínicos foram coletados do Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (GAL) e do Sistema de Controle de Pacientes com Tuberculose (TBWEB) do estado de São Paulo.

Identificação de isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Culturas primárias de micobactérias enviadas ao IAL em meio sólido ou líquido MGIT (do inglês, tubo indicador de crescimento de micobactérias) foram identificadas presuntivamente pela observação do crescimento e características microscópicas para diferenciar MTBC de micobactérias não tuberculosas (MNT). A identificação subsequente por testes fenotípicos, incluindo detecção de proteína MPT64, foi realizada sempre que necessário, como já descrito.^(12,13)

Teste de susceptibilidade fenotípico a medicamentos

Os isolados identificados presuntivamente como MTBC foram submetidos ao TSM pelo sistema automatizado BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickinson & Co., NJ, EUA),⁽¹⁴⁾ usando o protocolo modificado adequado às condições de rotina do IAL.⁽¹³⁾ As concentrações finais foram de 0,1 µg INH mL⁻¹ e 1,0 µg RIF mL⁻¹. Em caso de contaminação ou ausência de crescimento, a respectiva cultura primária foi submetida a mais testes de identificação da espécie.

Genótipo MTBDR_{plus} versão 2.0

Este ensaio foi realizado prospectivamente em 341 isolados, um por paciente, que estavam prestes a ser submetidos ao TSM em MGIT. As culturas foram submetidas à extração de DNA em agosto e outubro de 2014, um dia antes de entrarem no instrumento BACTEC.

A extração de DNA a partir de culturas líquidas ou sólidas foi realizada utilizando o kit Genolyse versão 1.0 (Hain)⁽¹⁵⁾ para não mais do que 23 isolados e um controle negativo por vez. O MDRTB_{plus} foi realizado como descrito anteriormente,⁽¹⁵⁾ e as reações detectadas nas tiras foram interpretadas visualmente com o auxílio de um gabarito. No caso de resultados inválidos, como nenhum sinal com o conjugado ou qualquer uma das outras sondas de controle, e reações duvidosas como reações fracas com as bandas de genes, o teste foi repetido usando nova extração de DNA.

Sequenciamento genético

O sequenciamento de Sanger foi realizado sempre que os resultados entre o MTBDR_{plus} e o TSM fenotípico permanecessem discordantes ao se repetir os dois testes. Isolados mostrando resultados conflitantes para INH tiveram a região reguladora *mabA-inhA* (posições -168 a 80, relativa ao códon) amplificada e sequenciada com os oligonucleotídeos iniciadores *mabA-inhAF* e *mabA-inhAR*,⁽¹⁶⁾ assim como foram sequenciados os genes completos *inhA* e *katG*, usando os pares de iniciadores *inhA3* e *inhA4*, *inhA3F* e *inhA5R*, e os oligonucleotídeos iniciadores anversos e reversos *katG-P4*, -P5, -P6, -P7 e -P8.⁽¹⁷⁾ Para isolados com resultados discordantes de RIF, utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores RPOB-1 e RPOB-2⁽¹⁸⁾ para amplificar e sequenciar um fragmento de 350-bp de *rpoB*, abrangendo a região determinante de resistência a RIF.

A PCR única incluiu 12,5 µl de Polimerase de DNA PrimeSTAR Max (Takara Bio, Shiga, Japão), 5 pmol de oligonucleotídeos iniciadores para *mabA-inhA* e *katG*, 10 pmol de oligonucleotídeos iniciadores para *inhA* e *rpoB*, 2 µL de DNA de amostra e água de grau de PCR para um volume final de 25 µL. A amplificação compreendeu 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 5 segundos e 72 °C durante 20 segundos. Os produtos amplificados purificados com ExoSAP-it (Affymetrix, SCL, CA, EUA) foram sequenciados com um Analisador Genético ABI 3130xL e o kit Big Dye Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems, FSTC, CA, EUA). As seqüências foram alinhadas e analisadas usando o software BioEdit v7.2.5⁽¹⁹⁾ e as ferramentas MUBII-TB-DB⁽²⁰⁾ e BLAST⁽²¹⁾ baseadas na internet.

Tempo de resposta dos resultados

O tempo necessário para realizar os testes TSM em MGIT e MTBDRplus foi registrado para calcular o tempo médio gasto para completar os testes. O tempo de resposta (TR) dos resultados foi calculado a partir da data de adição de ácido oleico-albumina-dextrose-catalase (OADC) e soluções antimicrobianas aos tubos MGIT até a data em que o laudo do resultado do TSM estava disponível; e desde a data de extração do DNA até a data em que o resultado do MTBDRplus foi escrito na folha de avaliação.

Análise dos dados

A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) do teste MTBDRplus foram avaliados para RIF e INH em comparação com o TSM fenotípico. A concordância entre os dois testes foi calculada pelo coeficiente kappa (k) e a força de concordância interpretada como ruim (<0,2), regular (> 0,2 ≤ 0,4), moderada (> 0,4 ≤ 0,6), boa (> 0,6 ≤ 0,8) e muito boa (> 0,8 ≤ 1).⁽²²⁾ O teste exato de Fisher bicaudal foi usado para comparações entre proporções. Diferenças nos TR foram avaliadas usando o teste *t* pareado. O limiar de significância foi estabelecido em 0,05. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa *OpenEpi*.⁽²³⁾

Declaração Ética

O Conselho Técnico-Científico (CTC-IAL nº 98C/2012) e o Comitê de Ética em Pesquisa (CEPIAL nº 207.606, de 21/02/2013) do IAL aprovaram este estudo.

RESULTADOS

Teste de susceptibilidade fenotípico a medicamentos

Os resultados do TSM em MGIT, juntamente com as características demográficas e clínicas dos pacientes,

são mostrados na Tabela 1. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (80%), tinha TB pulmonar (93%) e nenhum histórico de tratamento de TB (65%). A TBMR foi observada apenas em pacientes com TB pulmonar tratados anteriormente.

A Figura 1 mostra o plano de estudo dos 341 isolados testados prospectivamente. O TSM fenotípico forneceu resultados interpretáveis para 303 (89%) isolados, dos quais 276 (91%) foram suscetíveis, 14 (5%), monorresistentes a INH, 12 (4%) multirresistentes, e um (<1%) foi monorresistente a RIF.

Para as 38 culturas com resultados TSM inválidos devido à contaminação (n = 35) ou à ausência de crescimento (n = 3), a especificação subsequente identificou 23 MTBC, seis MTBC + MNT mistos e quatro culturas MNT. Entre os cinco isolados restantes, a identificação não foi avaliada devido ao crescimento insuficiente de três culturas primárias e à contaminação pesada em dois casos, ambos negativos para Ag MPT64, reportados como isolados não-MTBC.

Ensaio MTBDRplus

Todos os resultados duvidosos (n = 9) e inválidos (n = 2) tornaram-se válidos após a repetição do ensaio. O MTBDRplus deu resultados interpretáveis para todos os 341 isolados (Figura 1). Entre os 335 isolados identificados como MTBC, havia 308 (92%) suscetíveis, 12 (3,6%) multirresistentes, 12 (3,6%) monorresistentes a INH e três (1%) isolados monorresistentes a RIF.

O MTBDRplus apresentou resultados interpretáveis significativamente mais altos, fornecendo informações sobre 38 isolados adicionais (11%; IC 95% 8,1-14,8%; p<0,0001) para os quais não estavam disponíveis resultados de TSM em MGIT (Figura 1). Entre esses isolados, o teste genotípico identificou 32 MTBC (31 suscetíveis e um INH-monorresistente) e seis não-MTBC. Os isolados INH-monorresistente (um) e suscetíveis (sete) foram posteriormente confirmados pelo TSM para MGIT, em um segundo isolado.

Tabela 1. Características dos pacientes indicados para testes de sensibilidade à rifampicina e à isoniazida em agosto e outubro de 2014

Características	Pacientes	Ensaio de susceptibilidade a RIF e INH – sistema BACTEC 960 MGIT			
		Suscetível n = 276	Monorresistente n = 15*	Multirresistente n = 12	Teste inválido n = 38
Idade	37 ± 13, (range 1-84)	37 ± 13	44 ± 15	35 ± 12	38 ± 15
Sexo					
Masculino	272 (80)	225 (82)	10 (67)	8 (67)	29 (76)
Feminino	69 (20)	51 (18)	5* (33)	4 (33)	9 (24)
Apresentação clínica					
Pulmonar	317 (93)	259 (94)	14 (93)	12 (100)	32 (84)
Pulmonar e extrapulmonar	15 (4)	12 (4)	0	0	3 (8)
Extrapulmonar	9 (3)	5 (2)	1* (7)	0	3 (8)
Histórico de tratamentos					
Sem histórico (paciente novo)	222 (65)	191 (69)	6 (40)	0	25 (66)
Retratamento	119 (35)	85 (31)	9* (60)	12 (100)	13 (34)

Valores de idade expressos como média ± desvio padrão e os outros valores como n (%). *Um isolado é RIF-monorresistente e os outros são INH-monorresistentes. RIF: rifampicina; INH: isoniazida.

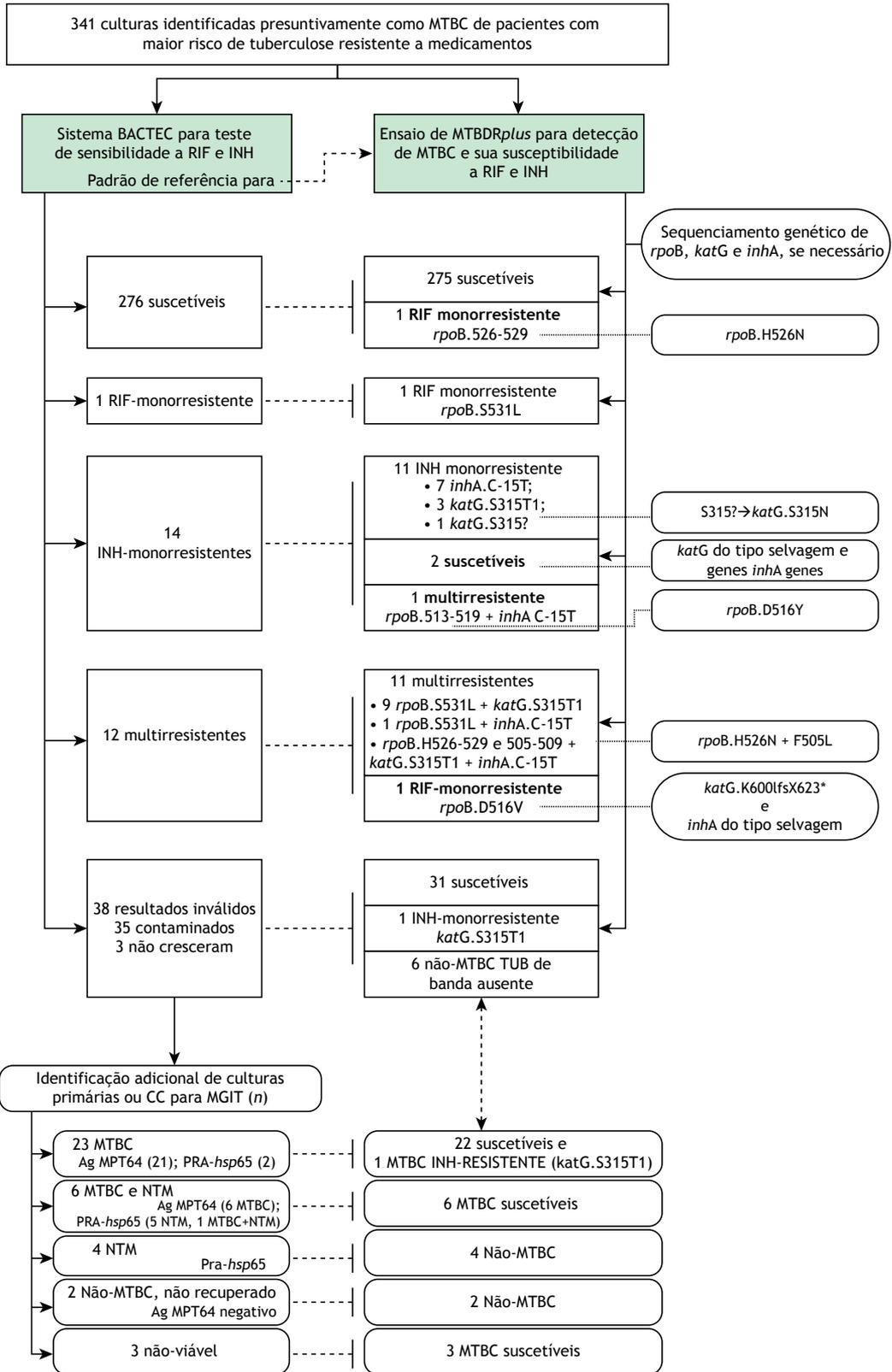


Figura 1. Fluxograma dos isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) neste estudo. RIF: rifampicina, INH: isoniazida; CC para MGIT CG: Tubo controle de crescimento no sistema BACTEC 960; Ag MPT64: detecção do antígeno MPT-64; PRA-*hsp65*: reação em cadeia da polimerase e análise por enzimas de restrição do gene *hsp65*, NTM: micobactérias não tuberculosas. *katG*.S315T1: T1 significa AGC→ACC exchange. *n.1798_1799insT, p.Lys600IlefsTGA623.

Tabela 2. Índices de desempenho do teste MTBDR $plus$ para a detecção de isolados resistentes a rifampicina, isoniazida e multirresistentes, e discordâncias em comparação com o teste fenotípico de susceptibilidade aos fármacos pelo sistema BACTEC MGIT 960.

Genótipo MTBDR $plus$ comparado ao MGIT 960					Resultados discordantes		
Desempenho	Correspondência de n/total	Proporção	IC 95%	n	Discordância	MTBDR $plus$	Sequenciamento genético
RIFAMPICINA							
Sensibilidade	13/13	100%	(77,2-100)	2	Falso-RIF ^R	<i>rpoB</i> mut 526-529 <i>rpoB</i> mut 513-519	<i>rpoB</i> - His526Asn <i>rpoB</i> - Asp516Tyr
Especificidade	288/290	99,3%	(97,5-99,8)				
Precisão	301/303	99,3%	(97,6-99,8)				
VPP	13/15	86,7%	(62,1-96,3)				
VPN	288/288	100%	(98,7-100)				
Concordância (k)	301/303	0,93	(0,81-1,04)				
ISONIAZIDA							
Sensibilidade	23/26	88,5%	(71,0-96)	3	Falso-INH ^S	<i>katG</i> and <i>inhA</i> - TS	<i>katG</i> and <i>inhA</i> - TS <i>katG</i> and <i>inhA</i> - TS <i>katG</i> - Lys600IlefsTGA623
Especificidade	277/277	100%	(98,6-100)				
Precisão	300/303	99,0%	(97,1-99,7)				
VPP	23/23	100%	(85,7-100)				
VPN	277/280	98,9%	(96,9-99,6)				
Concordância (k)	300/303	0,93	(0,82-1,05)				
Multirresistência							
Sensibilidade	11/12	91,7%	(64,6-98,5)	1*	Falso-INH ^S	<i>katG</i> and <i>inhA</i> - TS	<i>katG</i> - Lys600IlefsTGA623
Especificidade	290/291	99,7%	(98,1-99,9)	1†	Falso-RIF ^R (multirresistente)	<i>rpoB</i> mut 513-519	<i>rpoB</i> - Asp516Tyr
Precisão	301/303	99,3%	(97,6-99,8)				
VPP	11/12	91,7%	(64,6-98,5)				
VPN	290/291	99,7%	(98,1-99,9)				
Concordância (k)	301/303	0,91	(0,80-1,03)				

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; k: coeficiente kappa de Cohen; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; RIF^R: resistência à rifampicina; INH^S: susceptibilidade à isoniazida; mut: mutação; TS: tipo selvagem; *o isolado é uma das discordâncias da isoniazida nesta tabela. †o isolado é discordante de rifampicina nesta tabela.

Para a previsão de resistência a RIF, o MTBDR $plus$ apresentou 100% de sensibilidade (13/13), 99,3% de especificidade (288/290) e 99,3% de precisão (301/303), como mostrado na Tabela 2. O teste detectou corretamente a resistência a INH em 23/26 isolados (sensibilidade 88,5%) e suscetibilidade a INH em todos os 277 isolados (especificidade 100%), com acurácia diagnóstica geral de 99,0% (300/303). Os valores de VPP e VPN foram altos para resistência à RIF, resistência à INH e multirresistência, variando de 86,7% a 100%. A concordância entre os testes genotípico e fenotípico foi muito boa ($\kappa \geq 0,91$). Para averiguar a reprodutibilidade do teste, todas as 31 repetições confirmaram os primeiros resultados.

Discordância entre os testes

Quando os 303 resultados válidos pelo teste fenotípico foram comparados com os resultados dos testes

genotípicos, houve sete discordâncias. Após o subcultivos e repetição dos testes destes isolados, dois dos cinco isolados inicialmente resistentes à INH pelo TSM convencional coincidiram com os resultados do MTBDR $plus$. Os resultados dos cinco isolados que permaneceram discrepantes estão resumidos na Tabela 2. Os dois isolados de RIF falso-resistentes tiveram suas mutações *rpoB* confirmadas como His526Asn e Asp516Tyr por sequenciamento.

O MTBDR $plus$ não conseguiu detectar resistência a INH em dois isolados fenotipicamente INH-monorresistentes e um multirresistente. O sequenciamento genético mostrou que os dois primeiros isolados não tiveram mutações no gene *katG* nem *inhA*, enquanto o isolado multirresistente apresentou uma inserção de timina entre as posições 1.798 e 1.799 no gene *katG*, levando à mutação Lys600Ile e à formação precoce de um códon de parada (TGA), na posição 623 do gene.

Mutações nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA*

Dez perfis diferentes de mutação foram identificados entre os 27 isolados genotipicamente resistentes, como mostrado na Tabela 3. Em relação às mutações do gene *rpoB*, o mais frequente foi o Ser531Leu (11/15; 73%), principalmente entre os isolados fenotipicamente multirresistentes (10/12; 83%). A mutação His526Asn *rpoB* foi observada em um isolado fenotipicamente suscetível e no único isolado multirresistente apresentando mutações duplas no gene *rpoB* e mutações simultâneas *katG* e *inhA*. Ser315Thr1 (AGC → ACC *exchange*) foi a mutação *katG* mais frequente (14/16, 88%), observada principalmente nos isolados multirresistentes (10/12; 83%). A única mutação encontrada no gene *inhA* foi a C-15T (10; 100%), que foi mais frequente nos isolados monorresistentes à INH (8/12; 67%).

Tempo de resposta dos resultados

Para o ensaio MTBDRplus, duas rodadas consecutivas de extração de DNA, contendo 11 isolados e um controle cada, levaram cerca de 3 horas. A mistura de amplificação, ciclagem térmica, hibridação e interpretação dos resultados em uma rodada de 24 amostras levaram 50 minutos, 1

hora e 50 minutos, 2 horas e 20 minutos e 40 minutos, respectivamente. Portanto, a média de TR da extração de DNA para relatar os resultados de 24 amostras realizadas por uma pessoa sozinha foi de 8 a 9 horas no total.

Os TRs dos TSM em MGIT e MTBDRplus foram comparadas usando apenas resultados válidos no TSM convencional. A mediana do TR para liberar os resultados do MTBDRplus foi de 3 dias (zero a 17 dias), significativamente menor do que o do TSM em MGIT (mediana de 11 dias, 7 a 78 dias; $p < 0,0001$). Intervalos > 9 dias para 16 resultados de MTBDRplus foram devidos a indisponibilidade temporária do kit, e aqueles > 23 dias para a liberação de 12 laudos de TSM em MGIT foram devidos à repetição de testes apresentando falha de crescimento ou contaminação. Como mostrado na Figura 2, os resultados do MTBDRplus estavam disponíveis muito antes do que pelo MGIT, embora o teste tenha sido realizado por um único operador e em rodadas de 24 isolados. No 7º dia, quando os três primeiros (1%) resultados do TSM em MGIT foram reportados, já havia 231 (76%) resultados do MTBDRplus disponíveis. O número de testes completos pelo ensaio genotípico no 9º dia (287; 95%) foi obtido apenas no 14º dia pelo TSM para MGIT (285; 94%).

Tabela 3. Perfis de mutação em genes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência à rifampicina (RIF) e à isoniazida (INH) e teste de susceptibilidade fenotípico pelo sistema BACTEC MGIT 960.

n	Padrão de mutação			Resultados fenotípicos para RIF e INH
	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	
total = 27				
1	His526Asn	TS	TS	Suscetível
1	Ser531Leu	TS	TS	RIF ^R
7	TS	TS	C-15T	INH ^R
1	Asp516Tyr	TS	C-15T	INH ^R
1	TS	Ser315Asn	TS	INH ^R
4	TS	Ser315Thr (G>C)	TS	3 INH ^R ; 1 ND
9	Ser531Leu	Ser315Thr (G>C)	TS	RIF ^R - INH ^R
1	Asp516Val	Lys600IlefsTGA623	TS	RIF ^R - INH ^R
1	Ser531Leu	TS	C-15T	RIF ^R - INH ^R
1	Phe505Leu + His526Asn	Ser315Thr (G>C)	C-15T	RIF ^R - INH ^R

TS: tipo selvagem; RIF^R: resistente à rifampicina; INH^R: resistente à isoniazida; ND: não determinado em razão de contaminação.

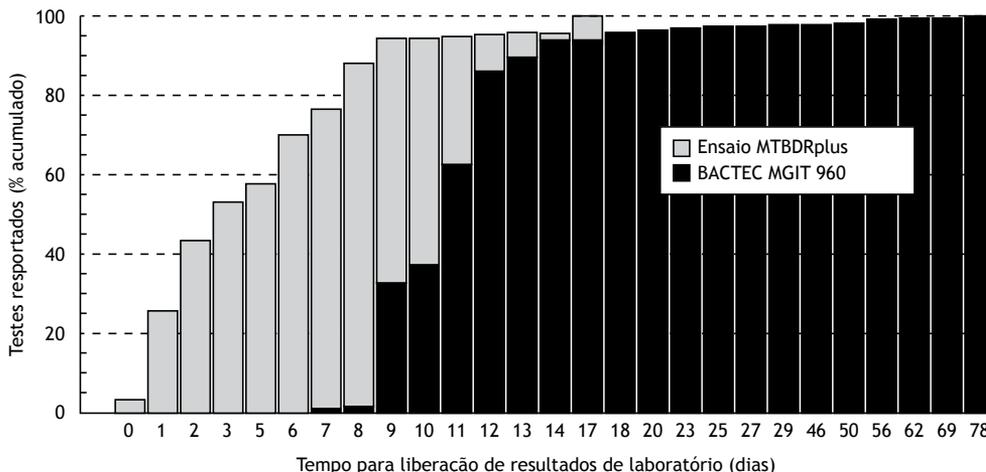


Figura 2. Intervalo de tempo entre o início do teste de sensibilidade a rifampicina e isoniazida e liberação de laudos de resultados.

DISCUSSÃO

Este estudo avalia o uso do ensaio MTBDR*plus* no fluxo de trabalho de um laboratório de rotina de TB no Sudeste do Brasil, onde cerca de 4.000 isolados de MTBC de pacientes com alto risco de TB resistente a medicamentos em São Paulo são submetidos a TSM em MGIT por ano. O ensaio molecular foi comparado com o TSM de referência no MGIT 960, e os resultados discordantes entre os dois métodos foram resolvidos pelo sequenciamento de Sanger. Os últimos relatórios anuais do IAL estimavam 91% de resultados válidos de TSM de primeira linha, dos quais 91% dos isolados eram suscetíveis a RIF e INH, 4% eram multirresistentes, 4% eram resistentes à INH, mas suscetíveis à RIF e <1% eram RIF-resistente mas INH-suscetível (dados não mostrados), confirmando que a amostra do estudo refletiu com precisão a população de isolados examinados a cada ano.

Nossos achados estão de acordo com uma revisão⁽²⁴⁾ que estimou as sensibilidades e especificidades agrupadas para predição de resistência a RIF (91,3% e 97,1%) e INH (89,4% e 98,9%). Em relação aos dados do Brasil utilizando o MTBDR*plus* em isolados clínicos, nossos achados são comparáveis com um estudo⁽²⁵⁾ no Estado de Minas Gerais, mostrando sensibilidades de 93,3% para RIF, 83,3% para detecção de multirresistência ou resistência a INH e 100% de especificidade para ambos medicamentos. Um estudo em pacientes com TBMR em Ribeirão Preto (SP) revelou sensibilidade de 100% e 80% na detecção de resistência a RIF e INH, respectivamente.⁽²⁶⁾

Neste estudo, as mutações Ser531Leu do gene *rpoB* e Ser315Thr do gene *katG* predominaram, como em outras situações.⁽²⁵⁻²⁸⁾ Identificar a mutação específica associada à resistência medicamentosa, que não é possível por métodos fenotípicos, pode fornecer informações adicionais sobre a categoria de resistência e guiar decisões terapêuticas, como a escolha do regime de tratamento.⁽²⁹⁾ Neste estudo, um isolado portador da mutação Asp516Val *rpoB*, que mostrou conferir resistência à RIF, mas não à rifabutina,^(7,28) ilustra como os testes genéticos podem ajudar os médicos a tratar casos resistentes à TB. Além disso, a tradução dos achados genéticos em terapia clínica tem implicações relevantes no uso de INH para TB-resistentes, uma vez que esse medicamento mostrou-se eficaz dependendo da mutação que confere resistência à INH.⁽³⁰⁾ A dose usual de INH é efetiva quando mutações ocorrem apenas na região promotora *inhA*, e para mutações apenas em *katG*, altas doses de INH ainda são uma opção para a maioria dos pacientes.^(30,31) Esses achados podem explicar a eficácia da INH no regime mais curto de tratamento para TBMR.

Algumas mutações de *rpoB* detectáveis apenas pela ausência de reação com as sondas do tipo selvagem no MTBDR*plus* podem não estar associadas à resistência à RIF.^(7,28,32) Este foi o caso de dois isolados fenotipicamente suscetíveis a RIF neste estudo, apresentando mutações nos códons *rpoB* 513-519 e 526-529, identificados ainda por sequenciamento

como Asp516Tyr e His526Asn, que mostraram não estar associados à resistência à RIF.^(7,28) Como não são verdadeiras as discordâncias com o teste fenotípico, não foi observada falsa resistência à RIF em nosso estudo. Os resultados acima demonstram claramente porque nos casos em que não ocorre nenhuma reação com as sondas de mutação, o sequenciamento ou TSM fenotípico deve ser realizado para melhor interpretar a resistência. Não encontramos na literatura publicada a dupla mutação *rpoB* Phe505Leu e His526Asn vista em um isolado neste estudo. O perfil multirresistente desse isolado, também abrangendo as mutações *katG* Ser315Thr e *inhA* C-15T, é semelhante ao recentemente descrito,⁽³³⁾ que apresentou Phe505Leu e Asp516Tyr, uma dupla mutação que confere resistência a RIF.⁽³²⁾

A sensibilidade à detecção da resistência à INH foi menor, como esperado, uma vez que pode surgir de mutações diferentes daquelas no códon 315 do *katG* e na região reguladora do *inhA*. Segundo Brossier et al.,⁽²⁷⁾ o MTBDR*plus* pode perder de 8% a 21% dos isolados resistentes à INH. Neste estudo, o MTBDR*plus* perdeu 2/25 isolados resistentes à INH, mas suscetíveis à RIF, e 1/12 de isolados multirresistentes. O isolado multirresistente diagnosticado erroneamente como RIF-resistente por si só teria sido submetido ao TSM em MGIT de primeira linha de acordo com o algoritmo do IAL atualmente em uso para isolados de amostras resistentes a *Xpert*. Portanto, a resistência INH desse isolado seria devidamente identificada pelo TSM em MGIT. A verdadeira resistência à INH dos outros dois resultados de INH falso-negativos provavelmente seria corretamente detectada durante o acompanhamento do tratamento da TB.

Com base na sensibilidade e especificidade do MTBDR*plus* e considerando as estimativas de prevalência da resistência INH entre 4.000 isolados recebidos anualmente no IAL, estimamos que esse teste perderia 34 dos 292 isolados resistentes à INH. Por outro lado, o MTBDR*plus* forneceria informações adicionais sobre as suscetibilidades a RIF e INH de 375 MTBC de um total de 446 isolados com resultados inválidos no TSM para MGIT, anualmente.

O TR mais curto para a conclusão do teste faz do MTBDR*plus* o método mais eficaz. A maioria dos laudos laboratoriais seria divulgada antes que 1% dos laudos do TSM em MGIT estivessem disponíveis. Além disso, a carga de trabalho para realização do TSM fenotípico seria drasticamente reduzida, proporcionando tempo para acomodar mais exames. Portanto, não só os pacientes presumidamente resistentes a TB teriam a oportunidade de iniciar o tratamento mais cedo com o regime mais adequado, como observado em Ribeirão Preto,⁽²⁶⁾ mas também poderíamos ampliar o acesso a pelo menos um TSM para todos os pacientes, como recomendado pela OMS.⁽²⁴⁾ Além disso, o MTBDR*plus* representa um risco biológico menor para o pessoal de laboratório do que o TSM convencional, uma vez que requer menos manipulação de culturas vivas.

Para os autores, este é o primeiro estudo prospectivo no Brasil avaliando a utilidade do MTBDR*plus* em um laboratório de referência de TB que atende o estado

brasileiro mais populoso. Ele fornece informações para a implementação desse teste no algoritmo de diagnóstico de TB no Brasil. No entanto, o estudo tem várias limitações. Primeiro, o número de isolados resistentes não foi grande o suficiente para tirar conclusões mais sólidas sobre a frequência e padrão de mutações em nosso meio. Segundo, não realizamos o teste de concentração inibitória mínima de isolados que apresentaram mutações, tampouco naquela que carrega uma combinação de duas mutações *rpoB* não descritas na literatura. Por fim, não investigamos a presença de mutações em isolados suscetíveis, pois apenas sequenciamos isolados mostrando resultados conflitantes ou não completamente identificados pelo MTBDR_{plus}.

Em conclusão, a precisão do diagnóstico do ensaio MTBDR_{plus} foi excelente na detecção de resistência ao MTBC para RIF e INH e multirresistentes. Nenhum isolado fenotipicamente suscetível foi erroneamente identificado como multirresistente, e nenhum isolado multirresistente foi incorretamente predito como suscetível a ambos os fármacos. As vantagens do teste, como a redução do tempo para o diagnóstico, a facilidade de execução e a obtenção de resultados adicionais, que de outra forma seriam inválidos pelo TSM fenotípico, impedem suas desvantagens, principalmente os resultados falsos suscetíveis à INH. Para diagnosticar a resistência clínica com precisão, a associação da natureza das mutações com o nível de suscetibilidade fenotípica deve ser cuidadosamente avaliada.

REFERÊNCIAS

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs—worldwide, 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2006;55(11):301-5.
- Orenstein EW, Basu S, Shah NS, Andrews JR, Friedland GH, Moll AP, et al. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(3):153-16.
- Stop TB Partnership and WHO. The global plan to stop TB 2006-2015. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2006.
- Bai Y, Wang Y, Shao C, Hao Y, Jin Y. GenoType MTBDR_{plus} Assay for Rapid Detection of Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150321.
- World Health Organization (WHO). Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy statement. Geneva, Switzerland: WHO, 2008.
- Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3699-703.
- Dominguez J, Boettger EC, Cirillo D, Cobelens F, Eisenach KD, Gagneux S, Hillemann D, Horsburgh R, Molina-Moya B, Niemann S, Tortoli E, Whitelaw A, Lange C; TBNET; RESIST-TB networks. Clinical implications of molecular drug resistance testing for Mycobacterium tuberculosis: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;20(1):24-42.
- World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2017. Geneva, Switzerland: WHO, 2017.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil [Internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2011 [cited 2019 Feb 28]. Available from: http://bvsmns.saude.gov.br/bvsm/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil.pdf
- Brasil. Ministério da Saúde. Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil. Boletim Epidemiológico [Internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2017 [cited 2019 Feb 28]. Available from: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/23/2017-V-48-N-8-Indicadores-prioritarios-para-o-monitoramento-do-Plano-Nacional-pelo-Fim-da-Tuberculose-como-Problema-de-Sa-de-P-blica-no-Brasil.pdf>
- Naing L, Winn T, Rusli BN. Medical Statistics. Practical issues in calculating the sample size for prevalence studies. *Arch Orofacial Sc* [Internet]. 2006 [cited 2019 Feb 28];1:9-14. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.504.2129&rep=rep1&type=pdf>
- Gallo JF, Pinhata JM, Chimara E, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Oliveira RS. Performance of an in-house real-time polymerase chain reaction for identification of Mycobacterium tuberculosis isolates in laboratory routine diagnosis from a high burden setting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(9):545-50.
- Adami AG, Gallo JF, Pinhata JM, Martins MC, Giampaglia CM, Oliveira RS. Modified protocol for drug susceptibility testing of MGIT cultures of Mycobacterium tuberculosis by the MGIT 960. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87(2):108-11.
- Siddiqi SH, Rüsçh-Gerdes S. MGIT 960 Procedure Manual; Foundation for innovative new diagnostics (Find) [Internet]. Geneva, Switzerland; 2006 [cited 2019 Feb 28]. Available from: https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf
- Cruvi V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as rifampin and isoniazid resistances. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1264-9.
- Perdigão J, Macedo R, João I, Fernandes E, Brum L, Portugal I. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: A molecular epidemiological perspective. *Microbiol Drug Resistance*. 2008;14(2):133-43.
- Machado D, Perdigão J, Ramos J, Couto I, Portugal I, Ritter C, et al. High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis of the Lisboa family is associated with inhA double mutations. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(8):1728-32.
- Portugal I, Maia S, Moniz-Pereira J. Discrimination of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis IS6110 fingerprint subclusters by *rpoB* gene mutation analysis. *J Clin Microbiol*. 1999;37(9):3022-4.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* [Internet]. 1999 [cited 2019 Feb 28];41:95-8. Available from: <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/jwb/papers/1999hall1.pdf>
- Flandrois JP, Lina G, Dumitrescu O. MUBII-TB-DB: a database of mutations associated with antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:107
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403-10.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* [Internet]. 1977 [cited 2019 Feb 28];33:159-74. Available from: https://www.dentalage.co.uk/wp-content/uploads/2014/09/landis_jr_koch_gg_1977_kappa_and_observer_agreement.pdf
- Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão. www.OpenEpi.com [Internet]. [cited 2019 Mar 13]. Available from: http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm
- World Health Organization (WHO). The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin: policy update. WHO/HTM/TB/2016.12. Geneva, Switzerland: WHO, 2016.
- Dantas NG, Suffys PN, Carvalho WD, Gomes HM, Almeida IN, Figueiredo LJ, et al. Correlation between the BACTEC MGIT 960 culture system with GenoType MTBDR_{plus} and TB-SPRINT in multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(11):769-74.
- Feliciano CS, Nascimento MM, Anselmo LM, Poente RH, Bellissimo-Rodrigues F, Bollela VR. Role of a GenoType MTBDR_{plus} line probe assay in early detection of multidrug-resistant tuberculosis at a Brazilian reference center. *Braz J Med Biol Res*. 2015;48(8):759-64.
- Brossier F, Veziris N, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of MTBDR_{plus} for detecting high/low levels of Mycobacterium tuberculosis resistance to isoniazid. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(2):260-5.
- Berrada ZL, Lin SY, Rodwell TC, Nguyen D, Schecter GF, Pham L, et al. Rifabutin and rifampin resistance levels and associated *rpoB* mutations in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis complex. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;85(2):177-81.
- Cabibbe AM, Sotgiu G, Izco S, Migliori GB. Genotypic and phenotypic M. tuberculosis resistance: guiding clinicians to prescribe the correct regimens. *Eur Respir J*. 2017;50:1702292.
- Cambau E, Viveiros M, Machado D, Raskine L, Ritter C, Tortoli E, et al. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicenter study. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(3):686-96.
- Rieder HL, Van Deun A. Rationale for high-dose isoniazid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2017;21(1):123-4.
- Miotto P, Tessema B, Tagliani E, Chindelevitch L, Starks AM, Emerson C, et al. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Eur Respir J*. 2017;50(6). pii: 1701354.
- Appelgren A, Morquin D, Dufour S, Le Moing V, Reynes J, Lotthé A, et al. Investigation of pre-XDR Beijing Mycobacterium tuberculosis transmission to a healthcare worker in France, 2016. *J Hosp Infect*. 2017;97(4):414-7