

Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida por mutações em duas regiões diferentes do gene katG*

Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two different regions of the katG gene

Helio Ribeiro de Siqueira, Flávia Alvim Dutra de Freitas, Denise Neves de Oliveira, Angela Maria Werneck Barreto, Margareth Pretti Dalcolmo, Rodolpho Mattos Albano

Resumo

Objetivo: Analisar e comparar as mutações em duas regiões diferentes do gene katG, responsáveis pela resistência à isoniazida (INH). **Métodos:** As análises foram feitas em 97 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes isoladas de culturas de escarro provenientes do Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Outras 6 cepas, sensíveis à INH, não apresentaram mutações e foram incluídas como controle. Duas regiões do gene katG (GenBank nº de acesso U06258) – região 1, do códon 1 até o códon 119, e região 2, do códon 267 até o códon 504 – foram amplificadas por PCR e sequenciadas para a identificação das mutações. **Resultados:** Sete cepas eram resistentes à INH e não mostraram mutação nas duas regiões. Trinta cepas apresentaram mutações na região 1, que se caracterizou por um grande número de deleções, especialmente no códon 4 (24 cepas). A região 2 mostrou 83 mutações pontuais, principalmente no códon 315, com 73 casos de troca de serina (AGC) para treonina (ACC). A análise da região 2 permitiu o diagnóstico de resistência à INH em 81,4% das cepas. Nove cepas tiveram mutações somente na região 1, e isso permitiu o aumento de identificação de cepas resistentes à INH para 90,6%. **Conclusões:** O número de mutações do códon 315 foi elevado, compatível com os casos descritos no Brasil e em outros países, e a análise da região 1 aumentou a detecção de mutações em mais 9,2%.

Descritores: Isoniazida; Mutação; Tuberculose; Resistência a múltiplos medicamentos.

Abstract

Objective: To analyze and compare the mutations in two different regions of the katG gene, which is responsible for isoniazid (INH) resistance. **Methods:** We analyzed 97 multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in cultures of sputum samples obtained from the Professor Hélio Fraga Referral Center, in Brasília, Brazil. Another 6 INH-sensitive strains did not present mutations and were included as controls. We used PCR to amplify two regions of the katG gene (GenBank accession no. U06258)—region 1, (from codon 1 to codon 119) and region 2 (from codon 267 to codon 504)—which were then sequenced in order to identify mutations. **Results:** Seven strains were resistant to INH and did not contain mutations in either region. Thirty strains carried mutations in region 1, which was characterized by a high number of deletions, especially at codon 4 (24 strains). Region 2 carried 83 point mutations, especially at codon 315, and there was a serine-to-threonine (AGC-to-ACC) substitution in 73 of those cases. The analysis of region 2 allowed INH resistance to be diagnosed in 81.4% of the strains. Nine strains had mutations exclusively in region 1, which allowed the proportion of INH-resistant strains identified to be increased to 90.6%. **Conclusions:** The number of mutations at codon 315 was high, which is consistent with cases described in Brazil and in other countries, and the analysis of region 1 resulted in a 9.2% increase in the rate at which mutations were identified.

Keywords: Isoniazid; Mutation; Tuberculosis; Drug resistance, multiple.

* Trabalho realizado no Laboratório de Genoma do Instituto de Bioquímica Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ – Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Endereço para correspondência: Helio Ribeiro de Siqueira. Av. 28 de setembro, 77, 2º Andar, Disciplina de Pneumologia e Tisiologia, Vila Isabel, CEP 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Tel 55 21 2587-6348. E-mail: drhelio@infolink.com.br

Apoio financeiro: Nenhum.

Recebido para publicação em 1/10/2008. Aprovado, após revisão, em 16/3/2009.

Introdução

Não obstante o avanço científico das duas últimas décadas, a TB permanece sendo a principal causa de morte no mundo — cerca de dois milhões de óbitos por ano — devido a um agente infeccioso único, o *Mycobacterium tuberculosis*.⁽¹⁾ Essa doença tem opção preferencial por pessoas pobres em países em desenvolvimento e teve sua incidência muito aumentada com o surgimento da infecção pelo HIV após o ano de 1980.⁽²⁻⁴⁾ Atualmente, a multirresistência (MR) — resistência pelo menos à isoniazida (INH) e à rifampicina (RMP),^(5,6) conforme o conceito internacional — e a TB extremamente resistente — multirresistência associada à resistência a uma fluoroquinolona e mais a uma medicação injetável (amicacina, capreomicina ou canamicina) — vêm se disseminando por movimentos migratórios e se constituem numa grande ameaça para o mundo, na ausência de novos fármacos capazes de reverter essa situação.^(7,8) No Brasil, um inquérito epidemiológico sobre a resistência aos fármacos usados no tratamento da TB mostrou maior resistência à INH, tanto nos casos virgens de tratamento (resistência primária), como no retratamento (resistência adquirida), sendo essas, respectivamente, de 4,4% e 11,3%.⁽⁹⁾ Esses valores foram baixos para a RMP, sendo a resistência primária e a resistência adquirida 1,3% e 6,6%, respectivamente. A resistência total para os outros medicamentos foi baixa (0,3% para a estreptomicina, 0,1% para o etambutol e praticamente 0% para a pirazinamida). A resistência primária combinada para INH e RMP foi de 1,1%. Isso permitiu que o tratamento inicial para a TB no Brasil fosse feito com a associação de três medicamentos — INH, RMP e pirazinamida. Atualmente o etambutol está sendo introduzido como quarto fármaco, de forma semelhante ao que já vem sendo feito nos países em que a resistência primária é alta.⁽¹⁰⁾ A mutação em genes específicos do bacilo é o principal mecanismo de sobrevivência (resistência) em relação a um determinado medicamento e ocorre quando a bactéria permanece em um ambiente em que a concentração do fármaco é menor do que a concentração inibitória mínima (resistência adquirida).⁽¹¹⁾ Ao contrário da RMP, em que 95% das mutações ocorrem em uma região bem determinada do gene *rpoB*,⁽¹²⁻¹⁴⁾ a resistência à INH pode ocorrer por mutações em vários genes, sendo os mais importantes o

katG (32-93% dos casos) e a região promotora do gene *inhA* (cerca de 15%).^(15,16) O gene *katG* codifica a enzima catalase-peroxidase, importante no metabolismo do bacilo.⁽¹⁷⁾ Essa enzima ativa a INH, que é uma pré-droga, produzindo radicais reativos de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrato) e radicais orgânicos que inibem a formação de ácidos micólicos da parede bacilar e produzem dano no DNA.^(18,19) A mutação mais comum no gene *katG* surge no códon 315 pela substituição do aminoácido serina (AGC) por treonina (ACC), com diminuição da ação da catalase, o que resulta em resistência à INH.⁽²⁰⁾ O gene *inhA* codifica a proteína carreadora de ácidos graxos (enoiil-ACP redutase NADH dependente) essencial na síntese de ácido micólico da parede celular.^(16,17) A INH ativada se liga à NADH e inibe a atividade da enzima NADH dependente, resultando em morte da bactéria, por interferência na síntese do ácido micólico. A mutação do gene *inhA* modifica a enzima, que perde afinidade pelo NADH, resultando em resistência à INH.⁽¹⁹⁾ A importância de outros genes, como *kasA*, *ndh* e a região intergênica *oxiR-ahpC*, não está bem estabelecida e necessita melhores estudos.

O gene *katG* possui 2.224 bases e 742 códons. Como o número de mutações que ocorrem no códon 315 é significativo, a região que o contém é bem estudada. O mesmo não acontece com a região inicial do gene, onde pode haver um número expressivo de mutações responsáveis pela resistência à INH.

Este trabalho teve por objetivo estudar as mutações na região inicial e na região que contém o códon 315 do gene *katG* e fazer correlações entre elas, em relação aos tipos e números de mutações.

Métodos

A pesquisa, da qual originou este trabalho, foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

Utilizamos para esta análise 97 cepas TB-MR de diferentes pacientes com TB pulmonar, fornecidas pelo Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Outras 6 cepas, sensíveis à INH e à RMP e sem mutações, foram utilizadas como controle. Das cepas TB-MR em estudo, 56 pertenciam a pacientes do estado do Rio de Janeiro e 41 de outros doze estados: PE (6), MA (5), PA (5),

SP (5), CE (4), PR (4), BA (3), GO (3), AM (2), PB (2), ES (1) e MG (1). Em 84 casos, a coleta do material se deu no período de 2002-2003 e, em 13, ocorreu no período de 1995-1997, quando foi realizado o inquérito epidemiológico de resistência aos fármacos.⁽⁹⁾ Desses casos, 4 apresentavam MR primária.

Os padrões de resistência aos medicamentos foram determinados pelo método das proporções no meio de Löwenstein-Jensen, de acordo com os procedimentos padronizados, com concentrações e proporções críticas de mutantes resistentes de 40 µg/mL e 1% para a RMP, respectivamente, e 0,2 µg/mL e 1% para a INH, respectivamente.⁽²¹⁾

Os DNAs genômicos foram obtidos de cepas em meio Löwenstein-Jensen, conforme a descrição de alguns autores.⁽²²⁾ As pesquisas no gene katG (GenBank número de acesso U06258) se concentraram em duas regiões de interesse. A região 1, que se inicia no nucleotídeo 1, que corresponde ao códon 1 (GTG, valina), primeiro aminoácido da proteína codificada e início do gene, ao nucleotídeo 357, códon 119. Essa região foi amplificada pela técnica de PCR com os *primers* oligonucleotídeos katG *sense* (5' A CTT CGC GAT CAC ATC CGT G 3') e katG *antisense* (5' GCG GCC GTC GTG GAT GCG GTA 3'). A região 2, com 711 nucleotídeos, tem início no nucleotídeo 801 do códon 267, termina no nucleotídeo 1512 do códon 504 e foi amplificada com os *primers* oligonucleotídeos katG *sense*: 5' CGG CGG TCA CAC TTT CGG TA 3'; katG *antisense*: 5' CCC GAC TTG TGG CTG CAG GC 3'. As reações de PCR foram realizadas com Platinum Taq (Invitrogen, Alemanha), 1,5 mM MgCl₂, 15 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM dNTPs, tampão de concentração simples para PCR, fornecido pelo fabricante, e 40 ng de DNA genômico. Os parâmetros para a reação de PCR foram os seguintes: desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos nas temperaturas 95°C por 45 s, 63°C por 45 s e 72°C por 1 min, terminando com um tempo de extensão de 10 min a 72°C. As amplificações por PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e os amplicons (frações amplificadas do DNA) purificados foram analisados no sequenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (GE Healthcare, Sunnyvale, CA, EUA). As sequências consenso de cada amostra foram comparadas com a sequência do katG do *M. tuberculosis* tipo selvagem (GenBank número de acesso U06258) para a determinação das mutações.

Tabela 1 – Cepas com mutações apenas na região 1.

Códons com mutações	Cepas, n
Deleção no códon 67	1
Deleção no códon 79	1
Deleção no códon 107	2
Deleção no códon 4	2
Deleção no códon 4 + Deleção no códon 65	1
Deleção no códon 4 + Mutação códon 1 Val (GTG) → Ala (GCG)	1
Mutação códon 93 Ala (GCC) → Thr (ACC)	1
Total	9

Ala: alanina; Thr: treonina; e Val: valina.

Resultados

Das cepas estudadas, 7 eram TB-MR e não apresentaram mutações em ambas as regiões. As outras 90 cepas tiveram mutações em pelo menos uma das regiões do katG, o que correlaciona as mutações com a resistência à INH.

As mutações (mutações pontuais, inserções e deleções) e a ausência das mesmas, que ocorreram concomitantemente nas regiões 1 e 2, são mostradas nas Tabelas 1, 2 e 3. Com exceção das mutações silenciosas e das mutações no códon 463 arginina (consideradas como polimorfismo porque não produzem resistência à INH), qualquer outro tipo de mutação, em uma ou em

Tabela 2 – Cepas com mutações apenas na região 2.

Códons com mutações	Cepas, n
Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC)	43
Mut códon 315 Ser (AGC) → Asn (AAC)	5
Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACA)	1
Mut códon 315 Ser (AGC) → Ile (ATC)	1
Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC) + Deleção no códon 485	1
Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC) + Deleção no códon 493	1
Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC) + Mut códon 399 Glu (GAA) p/ Glu (GAG) ^b	1
Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC) + Mut códon 463 Arg (CGG) p/ Leu (CTG) ^a	1
Mut códon 336 Leu (CTG) → Pro (CCG)	1
Mut códon 439 Gln (CAG) → TAG ^c	1
Mut códon 463 Arg (CGG) → Leu (CTG) ^a	2
Inserção no códon 439	2
Total	60

Mut: mutação; Arg: arginina; Asn: asparagina; Gln: glutamina; Glu: ácido glutâmico; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Pro: prolina; Ser: serina; e Thr: treonina. ^aPolimorfismo. ^bMutação silenciosa. ^cStop codon.

Tabela 3 – Cepas que apresentaram mutações em ambas as regiões.

Região 1 – Códon com mutações	Região 2 – Códon com mutações	Cepas, n
Deleção no códon 4	Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC)	12
Deleção no códon 4	Mut códon 315 Ser (AGC) → Asn (AAC)	2
Deleção no códon 4	Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACA)	1
Deleção no códon 4	Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC) + Mut códon 463 Arg (CGG) → Leu (CTG) ^a	1
Deleção no códon 4	Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC) + Mut códon 399 Glu (GAA) → Glu (GAG) ^b	1
Deleção no códon 4	Mut códon 328 Trp (TGG) → Arg (CGG) + inserção no códon 439	1
Deleção no códon 4 + deleção no códon 26 + deleção no códon 65	Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC)	1
Deleção no códon 4 + deleção no códon 2 + deleção no códon 11	Mut códon 412 Trp (TGG) → Cys (TGC)	1
Mut códon 17 Ser (AGC) → Thr (ACC) + inserção entre códon 92 e 93	Mut códon 315 Ser (AGC) → Thr (ACA)	1
Total		21

Mut: mutação; Ala: alanina; Arg: arginina; Asn: asparagina; Cys: cisteína; Glu: ácido glutâmico; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Pro: prolina; Ser: serina; Thr: treonina; Trp: triptofano; e Val: valina. ^aPolomorfismo. ^bMutação silenciosa.

ambas as regiões, produz sempre resistência à INH.

Conforme a Tabela 1, 9 cepas apresentaram mutações somente na região 1. A Tabela 2 mostra que 60 cepas apresentaram mutações apenas na região 2. A Tabela 3 descreve as mutações que ocorreram em 21 cepas, tanto na região 1, quanto na região 2.

Nas 30 cepas da região 1 (Tabelas 1 e 3), houve 33 deleções de nucleotídeos, sendo que a deleção do último nucleotídeo do códon 4 esteve presente 20 vezes separadamente e 4 vezes em associação com outras mutações. Apenas 1 inserção e 3 mutações foram registradas. Nas 81 cepas da região 2 (Tabelas 2 e 3), houve 2 deleções, 3 inserções e 83 mutações pontuais, sendo 73 no códon 315 (75,2% dos 97 casos). A mutação de serina (AGC) para treonina (ACC) ocorreu 62 vezes (56 como forma isolada e 6 associada a mutações em outros códons). A mutação de serina (AGC) para asparagina (AAC), para treonina (ACA) e para isoleucina (ATC) ocorreu 7, 3 e 1 vez, respectivamente. Nessa mesma região, houve 1 mutação silenciosa no códon 399, de ácido glutâmico (GAA) para ácido glutâmico (GAG), associada à outra mutação, responsável pela resistência à INH. Em 2 cepas, surgiram mutações isoladas no códon 463 e, em outras 2, elas estavam associadas à mutação do códon 315. A mutação no códon 439, de

glutamina (CAG) para (TAG) codifica um códon de parada de síntese de RNA (*stop codon*). As mutações da região 2 permitiram o diagnóstico de resistência à INH em 79 cepas (não considerando os dois polimorfismos – códon 463), ou seja, 81,4% dos 97 casos. Houve 9 cepas que não mostraram mutações na região 2, mas que tiveram mutações na região 1. Isso significa que essa região permitiu o acréscimo do diagnóstico de resistência a INH em mais 9,2%, o que aumentou a positividade do método para 90,6%.

Discussão

As mutações no gene *katG* ocorrem com frequência 100 vezes maior do que no gene *rpoB*. Mutações nesse gene devem levantar a possibilidade de mutações também no gene *katG*, pela frequência com que ambas ocorrem. Esse fato não pôde ser avaliado na nossa casuística porque as cepas foram selecionadas previamente por serem MR. Os 7 casos sem mutação em ambas as regiões eram resistentes à INH. Isso mostra que as mutações que causaram a resistência à INH ocorreram fora das regiões estudadas do *katG* ou em outros genes.⁽²³⁾

Na região 1, houve grande quantidade de inserções e deleções, produzindo como consequência a mudança de aminoácidos na proteína,

diminuição dos níveis de catalase e resistência à INH. Em 24 cepas, encontramos um novo alelo, ainda não descrito anteriormente, gerado pela deleção do último nucleotídeo adenina no códon 4 da região 1. A região 2 se caracterizou essencialmente por mutações, sendo a maioria no códon 315. Esse códon mutado é um marcador importante de resistência à INH, e sua frequência sofre variações regionais marcantes. Em um estudo realizado no Brasil, analisaram-se 97 cepas INH resistentes de dois estados (SP e PR).⁽²³⁾ Os autores observaram 83 mutações no gene *katG* (85,6%), sendo 60 no códon 315 (61,9%) e 23 (23,7%) em outros códons. Das 97 cepas estudadas, 14 (14,4%) não tiveram mutações no gene *katG*. Dessas, 12 (12,4%) apresentaram mutações em outros genes. O alelo arginina 463 leucina (polimorfismo) ocorreu em 2 casos (2,1%). No espaço correspondente à nossa região 1, houve 1 inserção no nucleotídeo 17 e 4 mutações. Na área correspondente à nossa região 2, ocorreram 2 inserções, 1 deleção e 74 mutações, sendo 58 no códon 315, principalmente de serina para treonina. Em outro trabalho no estado de São Paulo, analisaram-se 48 cepas resistentes à INH, compreendendo os códons 243 a 368 (376 nucleotídeos), que correspondem à região 2 da nossa análise. Houve mutação pontual no códon 315 em 60,4% das cepas, sendo a maioria (79,3%) de serina (AGC) para treonina (ACC).⁽²⁴⁾ A análise com 69 cepas INH resistentes, em três estados brasileiros, explorando o espaço correspondente à nossa região 2, mostrou mutações pontuais no códon 315 em 87,1; 60,9; e 60,0%, respectivamente, nos estados do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo.⁽²⁵⁾ Dois casos de mutação no códon 463 não implicaram em resistência à INH (polimorfismo). Em nossa casuística, a análise da região 2 permitiu o diagnóstico de resistência à INH em 81,4% das cepas, resultado semelhante ao que é observado na literatura. O nosso trabalho, estudando a região 1, produziu um acréscimo de 9,2% ao diagnóstico de resistência à INH.

A prevalência de mutações no códon 315 tem apresentado ampla variação, conforme a região geográfica no mundo. Uma pesquisa realizada em Kwazulu Natal, na África do Sul, com 79 cepas TB-MR, usando a técnica de polimorfismo de conformação de fita simples para pesquisar mutações em uma região de 209 pares de bases que contém o códon 315, diagnosticou 77 casos de resistência à INH (97,4%).⁽²⁶⁾ Em Barcelona, a análise de 61 cepas INH resistentes mostrou alterações no gene *katG* em 55%

dos casos, e as mutações no códon 315 foram as mais prevalentes (32%).⁽²⁷⁾ Resultados semelhantes foram vistos na avaliação de 45 cepas INH resistentes na Itália, quando ocorreram 17 casos de mutação no códon 315 (37,8%).⁽²⁸⁾ Em outro estudo realizado na Rússia, usou-se espectrometria de massa para o sequenciamento de 317 cepas resistentes à INH, originárias da região de Moscou, da Sibéria Ocidental e da região dos Urais. Houve 244 mutações no códon 315 (76,9%), sendo 243 de serina (AGC) para treonina (ACC). Em outras 44 cepas, houve mutações de serina (AGC) para treonina (ACC) associadas a mutações na região intergênica *mabA-inhA* e apenas 3 mutações no gene *inhA*. Portanto, ocorreram 288 mutações no códon 315 (90,8%), e 26 cepas resistentes à INH (8,2%) não mostraram mutações nos dois genes.⁽²⁹⁾

A mutação no códon 315, de serina (AGC) para treonina (ACC) é a mais frequente em todos os trabalhos. Possivelmente, esse tipo de mutação produz um ótimo balanço entre a atividade diminuída de catalase e o nível suficiente de atividade da peroxidase, o que daria condição de permanência ativa da bactéria resistente, com redução mínima de seu metabolismo.⁽¹⁸⁾

Partindo-se dos conhecimentos gerados pela análise das mutações que causam resistência à INH e à RMP, vem se tornando possível o desenvolvimento de técnicas mais simples de diagnóstico molecular de resistência por meio de *kits*, mas que ainda são dispendiosos para o uso de rotina no serviço público.⁽³⁰⁾

Em conclusão, a análise da região 1 aumenta o diagnóstico genotípico da resistência à INH, ocorrida por mutação, deleção ou inserção no gene *katG* e deve ser estudada em conjunto com a região 2.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos Professores Rogério Rufino e Claudia Henrique da Costa a leitura crítica do manuscrito.

Referências

1. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet*. 2003;362(9387):887-99.
2. Mendes JM, Lourenço MC, Ferreira RM, Fonseca Lde S, Saad MH. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from sputum samples from symptomatic outpatients: Complexo de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2007;33(5):579-82.

3. Hijjar MA, Procópio MJ, Freitas LMR, Guedes R, Bethlem E. Epidemiologia da tuberculose: importância no mundo, no Brasil e no Rio de Janeiro. *Pulmão RJ*. 2005;14(4):310-14.
4. Silveira JM, Sassi RA, Oliveira Netto IC, Hetzel JL. Prevalence of and factors related to tuberculosis in seropositive human immunodeficiency virus patients at a reference center for treatment of human immunodeficiency virus in the southern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2006;32(1):48-55.
5. Barroso EC, Mota RM, Santos RO, Sousa AL, Barroso JB, Rodrigues JL. Fatores de risco para tuberculose multirresistente adquirida. *J Pneumol*. 2003;29(2):89-97.
6. Dalcolmo MP, Andrade MK, Picon PD. Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control [Article in Portuguese]. *Rev Saude Publica*. 2007;41 Suppl 1:34-42.
7. Matteelli A, Migliori GB, Cirillo D, Centis R, Girard E, Raviglion M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(5):857-71.
8. Andrews JR, Shah NS, Gandhi N, Moll T, Friedland G; Tugela Ferry Care and Research (TF CARES) Collaboration. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: implications for the HIV epidemic and antiretroviral therapy rollout in South Africa. *J Infect Dis*. 2007;196 Suppl 3:S482-90.
9. Braga JU, Barreto AM, Hijjar MA. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995-97, IERDTB. Parte III: Principais resultados. *Bol Pneumol Sanit*. 2003;11(1):76-81.
10. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro de Tuberculose - Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *J Pneumol*. 2004;30(Suppl 1):S4-S56.
11. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(7):697-714.
12. Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, Steklova L, Vyshnevskiy B. High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1417-24.
13. Schilke K, Weyer K, Bretzel G, Amthor B, Brandt J, Sticht-Groh V, et al. Universal pattern of RpoB gene mutations among multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999;3(7):620-6.
14. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(2):267-74.
15. Telenti A. Genetics and pulmonary medicine. 5. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax*. 1998;53(9):793-7.
16. Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(4):1241-50.
17. Rouse DA, DeVito JA, Li Z, Byer H, Morris SL. Site-directed mutagenesis of the katG gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol*. 1996;22(3):583-92.
18. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis*. 1998;79(1):3-29.
19. Slayden RA, Lee RE, Barry CE 3rd. Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2000;38(3):514-25.
20. Slayden RA, Barry CE 3rd. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2000;2(6):659-69.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Helio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: Ministério da Saude; 2005.
22. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29(11):2578-86.
23. Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, et al. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(9):3373-81.
24. Höfling CC, Pavan EM, Giampaglia CM, Ferrazoli L, Aily DC, de Albuquerque DM, et al. Prevalence of katG Ser315 substitution and rpoB mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9(1):87-93.
25. Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO, Valim AR, Telles MA, Kritski A, et al. Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4471-4.
26. Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN, Roux L, York DF. Genomic mutations in the katG, inhA and aphC genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from KwaZulu Natal, South Africa. *Tuber Lung Dis*. 2000;80(1):47-56.
27. Coll P, Aragón LM, Alcaide F, Espasa M, Garrigó M, González J, et al. Molecular analysis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Barcelona. *Microb Drug Resist*. 2005 Summer;11(2):107-14.
28. Rindi L, Bianchi L, Tortoli E, Lari N, Bonanni D, Garzelli C. Mutations responsible for *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid resistance in Italy. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9(1):94-7.
29. Afanas'ev MV, Ikryannikova LN, Il'ina EN, Sidorenko SV, Kuz'min AV, Larionova EE, et al. Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(6):1057-64.
30. Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I. Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*. 2006;44(7):2338-42.

Sobre os autores

Helio Ribeiro de Siqueira

Professor Assistente. Disciplina de Pneumologia e Tisiologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ – Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Flávia Alvim Dutra de Freitas

Bióloga. Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ – Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Denise Neves de Oliveira

Bióloga. Laboratório de Genoma. Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ – Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Angela Maria Werneck Barreto

Bacteriologista Chefe. Laboratório de Micobactérias, Centro de Referência Professor Helio Fraga, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Margareth Pretti Dalcolmo

Coordenadora. Ambulatório de Multirresistência, Centro de Referência Professor Helio Fraga, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Rodolpho Mattos Albano

Professor Adjunto. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ – Rio de Janeiro (RJ) Brasil.