



Análise das mutações nas regiões de resistência a Rifampicina e Isoniazida do complexo *Mycobacterium tuberculosis* utilizando teste comercial de sonda em linha (LPA): Região Metropolitana da Baixada Santista (SP)

Analysis of mutations in the Rifampicin and Isoniazid resistance regions of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using commercial line probe assay (LPA): Metropolitan Region of Baixada Santista (SP)

Ana Carolina Chiou

Doutora em Ciências pelo Instituto Adolfo Lutz – Santos

Instituição: Instituto Adolfo Lutz – Santos

Endereço: R. Silva Jardim, 90, Vila Matias, Santos - SP, CEP: 11015-020

E-mail: anachiou@gmail.com

Andréa Gobetti

Doutora em Ciências pelo Instituto Adolfo Lutz – Santos

Instituição: Instituto Adolfo Lutz – Santos

Endereço: R. Silva Jardim, 90, Vila Matias, Santos - SP, CEP: 11015-020

E-mail: deagobetti@gmail.com

Assucena Marques Rodrigues Xavier

Graduação em Biomedicina pelo Instituto Adolfo Lutz – Santos

Instituição: Instituto Adolfo Lutz – Santos

Endereço: R. Silva Jardim, 90, Vila Matias, Santos - SP, CEP: 11015-020

E-mail: assucenarxx@gmail.com

RESUMO

INTRODUÇÃO: O Brasil está entre os 30 países que apresentam alta carga da doença. Em 2020, a incidência no Estado de São Paulo (ESP) foi de 34,8 /100 mil hab., a Região da Baixada Santista superou o ESP com 91,5/100 mil hab. O controle da TB droga resistente (TBDR) é um dos grandes desafios, no mesmo ano foram detectado 23 casos novos de multirresistencia no ESP. O teste molecular de sonda em linha - GenoType MTBDRplus tem se mostrado ferramenta importante na detecção da TBDR, dando agilidade ao direcionamento destes pacientes ao esquema terapêutico adequado. **OBJETIVO:** avaliar as mutações em regiões determinantes de resistência às drogas de 1º linha, rifampicina (RIF) e isoniazida (INH), do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) pelo teste molecular de sonda em linha - GenoType MTBDRPLUS, a partir de amostras clínicas de pacientes submetidas ao diagnóstico da tuberculose pulmonar (TBP) e traçar o perfil dos casos com notificação na TBWEB. **MÉTODOS:** Foram avaliadas 162 amostras no período de Janeiro a Junho de 2021, submetidas ao diagnóstico da TB na região metropolitana da Baixada Santista. **RESULTADOS:** Entre as 162 amostras, 130 (80,3%) foram amostras suscetíveis aos antibióticos; 08 (4,9%) monorresistentes a RIF; 03 (1,8%) monorresistentes a INH; 02 (1,2%) multiresistentes (MDR) e 19



(11,7%) com resultado inconclusivo. Grande parte da monorresistência a RIF, foi identificada pela ausência da banda rpoB WT7 e WT8. Nos casos de MDR, o padrão de bandas para RIF foi ausência da banda rpoB WT8/ presença banda rpoB MUT3 e para INH ausência de banda katG WT/ presença de banda katG MUT1. Quanto ao perfil dos casos, o mês de Maio/2021 apresentou o maior número de casos (24,6%), com amostras provenientes do município de São Vicente (29%), entre a 30-49 anos (25,3%), sexo masculino (70,9%) e de etnia parda (16,7%). As características sócio-demográficas apontam que 32,7% eram usuários de drogas, 9,8% HIV positivos. Avaliando o desfecho de tratamento anterior 17,2% abandonaram, destes, 60% dos casos já tinham sido submetidos de três a cinco tratamentos. **CONCLUSÃO:** O ensaio GenoType MTBDRplus é um teste excelente na detecção de resistência ao MTB para RIF, INH e MDR, reduzindo o tempo de diagnóstico.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose pulmonar, técnicas de diagnóstico molecular, testes de sensibilidade microbiana.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Brazil is among the 30 countries with a high burden of the disease. In 2020, the incidence in the State of São Paulo (ESP) was 34.8/100.000 inhab., the region of Baixada Santista surpassed the ESP with 91.5/100.000 inhab. The control of drug resistant TB (TBDR) is one of the great challenges, in the same year 23 new cases of multidrug resistance were detected in ESP. The online molecular probe assay - GenoType MTBDRplus has proved to be an important tool in the detection of TBDR, providing agility directing these patients to the appropriate therapeutic regimen. **OBJECTIVE:** to evaluate mutations in regions that determine resistance to 1st-line drugs, rifampicin (RIF) and isoniazid (INH), of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (CMTB) by the line molecular probe assay - GenoType MTBDRPLUS, from clinical samples of patients submitted to the diagnosis of pulmonary tuberculosis (TBP) and to trace the profile of the cases with notification in the TBWEB. **METHODS:** 162 samples were evaluated from January to June 2021, submitted to the diagnosis of TB in the metropolitan region of Baixada Santista. **RESULTS:** Among the 162 samples, 130 (80.3%) were samples susceptible to antibiotics; 08 (4.9%) monoresistant to RIF; 03 (1.8%) were monoresistant to INH; 02 (1.2%) were multidrug-resistant (MDR) and 19 (11.7%) with inconclusive results. Much of the mono-resistance to RIF was identified by the absence of the rpoB band WT7 and WT8. In MDR cases, the band pattern for RIF was absence of rpoB WT8 band/ presence of rpoB MUT3 band and for INH absence of katG WT band/ presence of katG MUT1 band. As for the profile of cases, the month of May/2021 had the highest number of cases (24.6%), with samples from the municipality of São Vicente (29%), between 30-49 years (25.3%), male (70.9%) and mixed race (16.7%). The socio-demographic characteristics indicate that 32.7% were drug users, 9.8% were HIV positive. Evaluating the outcome of previous treatment, 17.2% abandoned, of these, 60% of the cases had already been submitted from three to five treatments. **CONCLUSIONS:** The GenoType MTBDRplus assay is an excellent



test for detecting MTB resistance for RIF, INH, and MDR, reducing diagnostic time.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis pulmonary, molecular diagnostic techniques, microbial sensitivity tests

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um quarto da população mundial esteja infectado com o bacilo do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). No ano de 2021, aproximadamente 9,9 milhões de pessoas desenvolveram a tuberculose (TB) e 1,3 milhões vieram a óbito. As Américas foi à região mais afetada do mundo, e segundo o Relatório Global de Tuberculose de 2021, o Brasil, é o país com maior aumento na taxa de incidência desde 2016¹. O abandono é um dos principais obstáculos para OMS, pois aos primeiros sinais de melhora, os pacientes abandonam a medicação, negligenciando todo o processo de cura, e, assim, causando uma resistência aos medicamentos utilizados no tratamento. Em relação ao tratamento nos anos de 2018 e 2019, 12,0% dos casos novos de TB pulmonar (TBP) abandonaram o tratamento no Brasil, uma proporção superior ao recomendado pela OMS (5,0%)².

A resistência aos medicamentos pode ser denominada de Tuberculose monoresistente e Tuberculose Multirresistente (TB-MDR), que é definida por apresentar resistência a rifampicina e isoniazida. Para o diagnóstico da tuberculose resistente é possível detectar de uma forma rápida e precoce pelo teste molecular *line probe assay* (LPA) GenoType MTBDRPlus. É um ensaio de sonda em linhas que detecta mutações nos principais genes que predispõem a resistência a rifampicina e a isoniazida^{3,4}.

O GenoType MTBDRplus é um teste é um molecular em ensaio de sonda em linhas que detecta mutações associadas a resistência aos medicamentos de tratamento. Este teste dará informações genóticas referente a sensibilidade em um curto espaço de tempo comparados a outros testes atualmente. O teste tem como objetivo detectar o complexo *M. Tuberculosis* e da resistência a rifampicina e isoniazida, a partir de amostras pulmonares com baciloscopia positiva ou



negativa. Para a identificação da resistência à rifampicina é facultada pela detecção das mutações associados ao gene *rpoB*; e para resistência a isoniazida é analisado o gene *KatG* e a região promotora *inhA*.^{4,5}. Com o avanço nos últimos anos da TBDR a RIF e TB-MDR, é imprescindível a agilidade de diagnóstico, e o GenoType é um teste molecular promissor, que reduzirá o tempo de resultado, comparado aos testes fenotípicos de 1º e 2º linha e melhora no tempo de início do tratamento diminuindo a transmissibilidade da doença⁶.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral- Avaliar a suscetibilidade do complexo *M.tuberculosis* às drogas de 1º linha para TB pelo teste molecular GenoType MTBDRplus, a partir de amostras clínicas de pacientes submetidas a detecção da tuberculose pulmonar.

Objetivos Específicos – (i) caracterizar as principais mutações nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* das amostras processadas no período do estudo; **(ii)** caracterizar o perfil dos casos notificados na TBWEB segundo características sócio demográficas e aspectos do tratamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram obtidas e processadas no Instituto Adolfo Lutz (IAL) de Santos, no período de Janeiro a Junho de 2021. O critério de inclusão foi amostras de diagnóstico que apresentaram resultado positivo no Teste Rápido Molecular (TRM - GeneXpert®) para o complexo MTB e de exclusão amostras que tiverem resultado negativo no TRM e amostras de pacientes em controle de tratamento. O Teste de Sensibilidade molecular - MTBDRplus versão 2.0 foi realizado apenas nas amostras que atendiam ao critério de inclusão. Para a análise dos dados demográficos foi utilizado a busca no sistema de informação de Controle de Pacientes com Tuberculose (TBWEB) pelas variáveis: gênero, etnia, faixa etária, escolaridade, tipo de ocupação e relativas ao tratamento (desfecho e tratamento anterior). Os dados obtidos foram transportados para

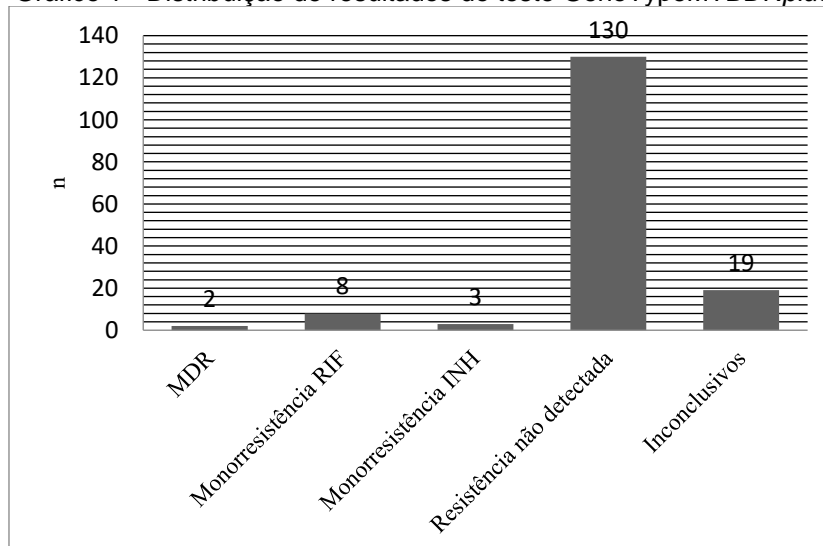


Excell e analisados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 162 amostras no presente estudo. O gráfico 1 mostra que 130 (80,2%) foram amostras não foram detectadas genes de resistência a RIF e INH; 08 (4,9%) amostras monorresistência a RIF; 03 (1,8%) monorresistência a INH; 02 (1,2%) amostras MDR e 19 (11,7%) com resultado inconclusivo.

Gráfico 1 - Distribuição de resultados do teste GenoTypeMTBDR_{plus}



Fonte: Autora, 2021

Estes resultados estão próximos com os reportados por BRANDÃO et al. (2019), onde foi apresentado ausência de mutações em RIF e INH em 92% das amostras analisadas no IAL de São Paulo. Das 13 de amostras que apresentaram perfil de resistência ao menos para RIF e INH foram observadas ausências de bandas do tipo selvagem (WT) e detectadas as bandas de mutações (MUT) dos respectivos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* (Tabela 1).



Tabela1- Frequência de mutações e ausências de bandas WT das 13 amostras com perfil de resistência às drogas antituberculosas de primeira linha pelo teste GenoType MTBDRplus-LPA.

N° (%)	Mutação	Perfil resistência
RIF (<i>rpoB</i>) (n=8)		
1 (12,5%)	MUT3	RIF ^R
1 (12,5%)	MUT2B/ ΔWT7 + WT8	RIF ^R
4 (50,0%)	Δ WT7	RIF ^R
1 (12,5%)	Δ WT5	RIF ^R
1 (12,5%)	Δ WT7 + WT8	RIF ^R
INH (<i>katG</i>) (n=1)		
1 (100,0%)	MUT1	INH ^R
INH (<i>inhA</i>) (n=2)		
1 (50,0%)	MUT1	INH ^R
1 (50,0%)	MUT1 / Δ WT1	INH ^R
MDR (n=2)		
2 (100%)	MUT3 / Δ WT8 (<i>rpoB</i>) MUT1 / ΔWT (<i>katG</i>)	RIF ^R INH ^R

Δ: Ausência de banda selvagem na DNA-STRIP.

Fonte: Autor, 2021

Em 46% (6/13) das amostras o padrão de resistência à RIF foi devido a ausência de hibridação na sonda selvagem, *rpoB* WT7, assim como foi encontrado, em Ribeirão Preto⁷. Nos casos de resistência à INH foi encontrada o padrão de mutação *inhA* MUT1 (1/13) e *katG* MUT1 (2/13) em 7,7% casos. Nos MDR (2/13), os perfis encontrados responsável pela resistência à RIF foram a ausência de banda *rpoB* WT8 e mutação no gene *rpoB* MUT3, e com relação à resistência à INH ausência de banda *katG* WT e presença de *katG* MUT1.

Com o objetivo de caracterizar o perfil epidemiológico dos pacientes com TB (Tabela 2) pode-se observar que ocorre uma predominância no sexo masculino (115; 71,0%) de etnia parda (60; 52,2%) de 30 a 39 anos de idade (36; 31,3%). Em questão de escolaridade apenas 03 (1,9%) pacientes possuíam mais de 15 anos de estudos, e 67 (41,4%) possuíam apenas o ensino fundamental, 45 (27,7%) pacientes estavam desempregados, 04 (2,4%) detentos e 92 (57,7%) identificadas como outras sem fazer referência ao tipo de ocupação.



Tabela 2- Características sociodemográficas dos pacientes segundo variáveis obtidas na TBWEB.

Características	Sexo		Total (N=162) (N / %)
	Feminino (N=47) (N / %)	Masculino (N=115) (N / %)	
Feminino (N/%)			
Etnia			
Pardo	26 (55,3%)	60 (52,2%)	86 (53,0%)
Branco	11 (23,4%)	32 (27,8%)	43 (26,5%)
Preto	8 (17,0%)	15 (13,1%)	23(14,2%)
Ignorado	2 (4,6%)	6 (5,2%)	8 (4,9%)
Amarelo	-	2 (1,7%)	2 (1,2%)
Faixa etária			
10 -14anos	1 (2,1%)	-	1 (0,6%)
15 -19anos	7 (14,9%)	10 (8,7%)	17 (10,5%)
20 -29anos	10 (21,3%)	-	10 (6,2%)
30 -39anos	11 (23,4%)	36 (31,3%)	47 (29,0%)
40 -49anos	6 (12,8%)	33 (28,7%)	39 (24,1%)
50-59anos	7 (14,9%)	16 (13,9%)	23 (14,2%)
60 -69anos	4 (8,5%)	14 (12,2%)	18 (11,1%)
70 -79anos	1 (2,1%)	6 (5,2%)	7 (4,3%)
Escolaridade			
De 1 a 3anos	1 (2,1%)	5 (4,3%)	6 (3,7%)
De 4 a 7anos	20 (42,6*%)	47 (40,9%)	67 (41,4%)
De 8 a 11anos	13(27,6%)	30 (26,1%)	43 (26,6%)
De 12 a 14anos	3 (6,4*%)	17 (14,8%)	20 (12,4%)
15 anos e mais	2 (4,3%)	1 (0,9%)	3 (1,9%)
Ignorado	8 (17,0%)	14 (12,1%)	22 (13,5%)
Nenhuma	-	1 (0,9%)	1 (0,6%)
Tipo de Ocupação			
Aposentado	2 (4,3%)	7 (6,1%)	9 (5,5%)
Desempregado	13 (27,7%)	32 (27,8%)	45 (27,7%)
Detento	1 (2,1%)	3 (2,6%)	4 (2,4%)
Dona de Casa	12 (25,5%)	-	12 (7,4%)
Outras	19 (40,4%)	73 (63,5%)	92 (57,7%)

Fonte: Autor, 2021.

Os dados observados corroboram de outro estudo realizado também na cidade de Santos, Baixada Santista, que mostrou 69% dos casos de TB em pacientes do gênero masculino e 69,7% em seus 20-49 anos de idade⁸. SOARES et al., 2017 analisando o perfil dos pacientes em Pernambuco, também afirma que 65% dos casos eram do sexo masculino e 45,3% tinham entre 20-39 anos, o que pode estar relacionado com a busca tardia dos homens ao atendimento médico e faixa etária economicamente ativa⁹. Em 2019, no ESP a proporção de cura entre os casos novos de TB pulmonar foi de 79% (13.965 pessoas) e a de abandono de 12% (2.063 pessoas), números muito distantes das metas propostas mundialmente².



5 CONCLUSÃO

O ensaio GenoType MTBDR*plus*-LPA é um teste excelente na detecção de resistência ao complexo MTB para RIF, INH e multirresistentes, onde no presente estudo 80,2% susceptíveis a RIF e INH, 4,9% resistência a RIF detectada, 1,8% resistência a INH detectada e 1,2% resistência a RIF e INH detectadas. O teste tem como suas vantagens e impacto, a redução do tempo para o diagnóstico, a fácil execução em laboratórios com boa infraestrutura e treinamento técnico, além da informação genotípica onde grande parte de nossos resultados, da resistência a RIF, foi identificada pela ausência de hibridação *rpoB* do tipo WT7 e WT8 e em casos de multiresistência, a ausência do *rpoB*WT8 e *katG*WT, e apresentação das mutações nos genes *rpoB* MUT3 e *katG*MUT1.



REFERÊNCIAS

- WORD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report**. Geneva, 2021.
- BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. **Tuberculose 2021**. [Internet]. 2021. Número Especial | Mar. 2021.
- BALLESTERO, J. G. A. Manejo da tuberculose multirresistente: elementos centrais das recomendações brasileiras. *J Bras Pneumol. Ribeirão Preto*. 46(2); 2020.
- DORMAN, S. E. et al. Genotype MTBDRplus for Direct Detection of Mycobacterium Tuberculosis and Drug Resistance in Strains from Gold Miners in South Africa. **Journal of Clinical Microbiology**. [S.l.] p.1189- 1194.
- HAIN. **GenoType MTBDRplus Instruções**. [S.l.] 2015.
- BRANDÃO, A. P. et al. Agilizando o diagnóstico da Tuberculose multirresistente em uma região endêmica Com o uso de um teste comercial de sondas em linha. **J Bras Pneumol**. São Paulo. 45 (2); 2019.
- FELICIANO, C. S. et al. Role of a GenoType MTBDRplus line probe assay in early detection of multidrug-resistant tuberculosis at a Brazilian reference center. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** [online]. 2015, v. 48, n. 08, pp. 759-764.
- COELHO A. G. V. et al. Características da tuberculose pulmonar em área hiperendêmica- município de Santos (SP). **J Bras Pneumol**. 2009; 35(10): 998-1007.
- SOARES, M. L. M. et al. Aspectos sociodemográficos e clínico epidemiológicos do abandono do tratamento de tuberculose em Pernambuco, Brasil, 2001-2014. **Epidemiol. Serv. Saúde**; [S.l.] 26 (2); Apr-Jun 2017.