

Rita Macedo*¹
António Amorim¹
Edna Pereira¹

Tuberculose multirresistente: Detecção directa em amostras respiratórias com o método de genética molecular MTBDRplus®

Multidrug-resistant tuberculosis: Rapid molecular detection with MTBDRplus® assay in clinical samples

Recebido para publicação/*received for publication*: 08.08.25
Aceite para publicação/*accepted for publication*: 08.12.30

Resumo

Uma das principais problemáticas no controlo da tuberculose é o aparecimento de casos de tuberculose multirresistente (TB-MR) e tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR). A detecção precoce da resistência a fármacos, directamente a partir de amostras respiratórias, é essencial para que se assegure o tratamento atempado, adequado e eficaz da tuberculose, bem como para prevenir a disseminação destes casos de especial gravidade.

O nosso objectivo foi avaliar a sensibilidade e comparar os resultados obtidos com um método de genética molecular disponível comercialmente – MTBDRplus® – e o isolamento, identificação e testes de sensibilidade.

Abstract

Nowadays, the greatest concern of tuberculosis control programmes is the appearance of multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis. Rapid determination of drug resistance in clinical samples, with *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), is the prerequisite for initiating effective chemotherapy, ensuring successful treatment of the patient and preventing further spread of drug-resistant isolates.

The aim of our study was to determine the sensitivity of the new MTBDRplus® assay in comparison to culture, identification and classic DST, directly from smear-positive clinical specimens.

¹ Laboratório de Saúde Pública: Micobacteriologia/ Tuberculose, Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, IP/*Public Health Laboratory: Mycobacteriology/Tuberculosis, Regional Health Administration, Lisbon and Tagus Valley Health Authority*

* rita.macedo@csalcantara.min-saude.pt

Correspondência / Correspondence to:

Laboratório de Saúde Pública – Micobacteriologia/ Tuberculose
Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, I.P.
Rua Pedro Cálmon, n.º 25
1300-455 Lisboa
Tel: +351 213602520
Fax: +351 213602525

de clássicos, directamente a partir de amostras respiratórias. Estudamos 68 amostras, com baciloscopia positiva.

O MTBDRplus® permitiu identificar, directamente a partir das amostras respiratórias, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* em todos os casos em que o estudo cultural e a identificação clássica chegaram a esse mesmo resultado. Nas amostras em que culturalmente isolámos estirpes sensíveis, com o MTBDRplus® encontramos sempre perfis genéticos do tipo selvagem (63,2%). Relativamente às amostras em que culturalmente isolámos estirpes resistentes, com o MTBDRplus® encontramos sempre perfis genéticos com mutações ou com ausência do perfil do tipo selvagem (36,8%).

Este estudo permitiu concluir que o MTBDRplus® assegura a detecção rápida de resistências a fármacos em estirpes do complexo *M. tuberculosis*, com resultados totalmente sobreponíveis aos obtidos com os métodos bacteriológicos clássicos.

Rev Port Pneumol 2009; XV (3): 353-366

Palavras-chave: Tuberculose, multirresistência, diagnóstico laboratorial.

A total of 68 smear-positive sputum specimens were processed by both the classical mycobacteriological methods and the molecular assay, MTBDRplus®.

MTBDRplus® assay allowed an accurate identification of MTC species by detection of the specific band in all samples, from which we also isolated and identified MTC strains by culture methods. In the samples from which we isolated susceptible strains (63.2%), wild type patterns were found using MTBDRplus® assay. The samples from which we isolated resistant strains (36.8%) showed specific mutations associated with the correspondent resistant phenotype.

Our study indicated that this assay allows rapid detection of resistance, always in agreement with classic methods.

Rev Port Pneumol 2009; XV (3): 353-366

Key-words: Tuberculosis, multi-drug resistance, laboratory diagnosis.

Introdução

A tuberculose continua a apresentar distribuição mundial com uma taxa de incidência global a aumentar 0,4% ao ano. Existem em todo o mundo 2 biliões de infectados, 8,4 milhões de casos novos/ano e 16 milhões de doentes, situação dramática, tendo em conta que a sua localização geográfica é sobreponível à das regiões com maior prevalência de SIDA¹. De facto, anualmente ocorrem cerca de 1,6 milhões de novos casos na África subsariana, 3 milhões no Sudeste Asiático e mais de um quarto de milhão na Europa Oriental. De

Introduction

Tuberculosis continues to be a worldwide disease whose global rate rises 0.4% per year. There are 2 billion people infected worldwide, 8.4 million new cases per year and 16 million patients, a dramatic state of affairs seeing as its geographic spread is in regions which also have higher rates of AIDS¹. There are ca. 1.6 million new cases per year in sub-Saharan African, 3 million in South-East Asia and over a quarter of a million in Eastern Europe. WHO data states the number of cases of infection is still rising, particularly

acordo com os dados publicados pela OMS, o número de casos novos de doentes bacilíferos continua a aumentar, particularmente na África e na Ásia, assistindo-se a um decréscimo nos países da América do Norte e da Europa¹. Portugal é o país europeu com a maior incidência de tuberculose (TB): 27 casos novos por 100 000 habitantes em 2007, mais do dobro da média da União Europeia, com 12,8 casos novos por 100 000 habitantes².

Por outro lado, em 2005, a OMS declarou que 1,1% dos casos novos de TB em todo o mundo eram casos de tuberculose multirresistente (TB-MR)³.

O aparecimento de estirpes resistentes é fundamentalmente consequência do uso indevido dos antibióticos, uma vez que se verifica que estirpes selvagens de *M. tuberculosis* que nunca foram expostas a antimicrobianos quase nunca apresentam qualquer tipo de resistência^{4,5}. O aparecimento de estirpes de TB-MR – definida como a resistência simultânea pelo menos à isoniazida (INH) e à rifampicina (RIF) – representa a maior dificuldade para os programas de controlo, na medida em que o tratamento destes casos é mais complexo, mais caro e, muito frequentemente, menos bem sucedido. Recentemente, foram identificadas novas estirpes de TB-MR que mutaram para formas ainda mais agressivas – tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR)^{6,7}. Estas estirpes, para além de MR, são resistentes a um dos antibióticos de segunda linha injectáveis (amicacina – AM, canamicina – KM e capreomicina – CAP) e a uma fluoroquinolona (FQ). Assim, é de extrema importância desenvolver métodos de diagnóstico mais rápidos para determinar os casos resistentes, de forma a assegurar uma terapêutica adequada para um tratamento eficaz e prevenir a disseminação destes casos mais graves⁸.

in Africa and Asia, while decreasing in North America and Europe¹. Portugal is the European country with the highest rate of tuberculosis (TB): 27 new cases per 100 000 inhabitants in 2007, more than double the European Union average of 12.8 new cases per 100 000 inhabitants². The WHO further declared in 2005 that 1.1% of new TB cases worldwide were cases of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)³.

The emergence of resistant strains is essentially due to the incorrect use of antituberculous drugs, as is has been seen that wild type patterns of *M. tuberculosis* which were never exposed to an antimicrobial drug almost never presented any kind of resistance^{4,5}. The emergence of MDR-TB – defined as simultaneous resistance to at least isoniazid (INH) and rifampin (RIF) – represents the greatest difficulty for control programmes as treating these cases is very complex, expensive and often less successful. New MDR-TB strains were recently identified which mutated into even more aggressive forms: extensively drug-resistant tuberculosis, or XDR-TB^{6,7}. These strains are MDR and also resistant to one injectional second line antituberculous drug (amikacin – AM, kanamycin – KM and capreomycin – CAP) and a fluoroquinolone (FQ). Thus it is extremely important to develop quicker diagnostic methods to identify resistant cases and so guarantee suitable chemotherapy for effective treatment of the patient, preventing further spread of drug-resistant isolates⁸.

RIF and INH are two of the drugs more used in first line TB treatment. RIF is a semi-synthetic derivative of rifamycin which works through inhibiting genetic transcription⁹. RIF resistance occurs through a common route, exclusively attributed to muta-

O aparecimento de estirpes resistentes é fundamentalmente consequência do uso indevido dos antibióticos

A RIF e a INH são dois dos fármacos mais usados no tratamento de primeira linha da TB. A RIF é um derivado semissintético da rifamicina, cujo mecanismo de acção consiste na inibição da transcrição génica⁹. A resistência à RIF ocorre por uma estratégia comum, exclusivamente atribuída a mutações que ocorrem no gene *rpoB* que codifica para a subunidade β da RNA polimerase. Em cerca de 96% dos casos, os isolados resistentes apresentam mutação numa região bem definida de 81 bp, o que torna a sua identificação muito facilitada^{9,10}. As mutações mais comuns ocorrem nos codões 526 e 531 e conferem um elevado grau de resistência (CMI > 32 $\mu\text{g/mL}$).

A INH é um pró-fármaco que requer uma activação enzimática para se tornar activo. *In vitro*, esta activação, efectuada por uma catalase-peroxidase, resulta numa espécie altamente reactiva com elevado poder oxidativo^{9, 11}. O mecanismo pelo qual ocorre resistência à INH é muito complexo e tem sido atribuído a mutações individuais em inúmeros genes: *katG* que codifica uma catalase-peroxidase, *inhA*, uma enzima envolvida na síntese dos ácidos micólicos, e o *kasA*, uma proteína sintetase cetoacil-transportadora. Vários estudos têm demonstrado que as mutações no gene *katG* são responsáveis pela resistência na maior parte dos casos^{9,12}. Destes, a maioria apresenta a mutação S315T, que reduz em 50% a actividade da enzima catalase-peroxidase e, conseqüentemente, a capacidade de activação da INH¹¹⁻¹³. Segundo vários autores, o segundo gene mais frequentemente envolvido na resistência à INH é o gene *inhA*, que se estima ser responsável por cerca de 25% dos casos resistentes^{9,11}. O gene *inhA* codifica para a enzima enoil-ACP reductase que é sobreexpressa no caso de haver mutação. Esta mutação encontra-se normalmente na região reguladora do gene¹⁴. Nas estirpes de

tions which occur in the *rpoB* gene which codifies the β subunit of polymerase RNA. In around 96% of cases, the drug-resistant isolates present in a well-defined region of 81 bp, making their identification easier^{9,10}. The most common mutations involve codons 526 and 531 and confer a high degree of resistance (CMI > 32 $\mu\text{g/mL}$).

INH is a pro-drug requiring enzymatic activation to become active. *In vitro* this activation, performed by a peroxidase catalyst, results in a highly reactive species with high oxidative power^{9,11}. The mechanism by which resistance to INH occurs is very complex and has been attributed to individual mutations in several genes: *katG* which codifies a peroxidase catalyst, *inhA*, an enzyme involved in the synthesis of mycolic acids and *kasA*, a synthase protein ketoacyl transporter. Several studies have shown that mutations in the *katG* gene are responsible for resistance in the greater part of cases^{9,12}. In these, the majority present the S315T mutation which reduces peroxidase catalyst enzyme activity by 50% and thus INH capacity for activation¹¹⁻¹³. Various authors believe that the second gene most frequently involved in resistance to INH is *inhA*, felt to be responsible for around 25% of resistant cases^{9,11}. The *inhA* gene codifies for the enzyme enoil-ACP reductase which is over-expressed when there is mutation. This mutation is normally found in the regulator region of the gene¹⁴. The exact opposite has been seen in the *M. tuberculosis* strains isolated in Portugal, with the promoter region of the *inhA* gene responsible for the greater part of INH resistant cases¹⁵.

In view of all these molecular regions responsible for the resistant phenotypes, the

M. tuberculosis isoladas em Portugal tem-se verificado exactamente o oposto, sendo a região promotora do gene *inhA* responsável pela maioria dos casos resistentes à INH¹⁵.

Tendo em conta a existência de todas estas regiões moleculares responsáveis pelos fenótipos de resistência, a implementação de técnicas capazes de identificar as referidas mutações surge como uma alternativa a considerar para a detecção destes casos mais graves¹⁶. De facto, os métodos convencionais de identificação e detecção de resistência são ainda muito demorados (média de 10-15 dias), mesmo após a introdução dos métodos não radiométricos totalmente automatizados, e requerem a existência de uma cultura positiva¹⁷.

Resultados mais rápidos podem ser conseguidos aplicando tecnologias de biologia molecular directamente à amostra clínica do doente e tendo em conta que a resistência à INH e RIF em *M. tuberculosis* está sempre associada a mutações nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA*¹⁸⁻²². O método molecular GenoType MTBDRplus® (Hain Lifescience GmbH) permite fazer o diagnóstico rápido à amostra e detecta as mutações mais comuns nestes genes^{21,23}. Assim, o objectivo do estudo foi determinar a sensibilidade deste teste molecular, comparando os resultados obtidos por estudo directo de amostras respiratórias com os resultados obtidos com os métodos de identificação e antibiograma tradicionais, após cultura positiva.

Materiais e métodos

Amostras estudadas

Estudámos secreções respiratórias de doentes com quadro clínico compatível com tuberculose pulmonar, enviadas para o Laboratório de Saúde Pública – Micobacteriologia/Tuberculo-

implementation of techniques capable of identifying the abovementioned mutations emerges as an alternative to consider for detecting these more severe cases¹⁶. Conventional methods for identifying and detecting resistance still take quite a while (mean 10-15 days), even with the introduction of completely automated nonradiometric systems, and require a positive culture¹⁷.

Quicker results can be obtained by applying molecular biology technologies directly to the patient's clinical sample and bearing in mind that resistance to INH and RIF in *M. tuberculosis* is always associated to mutations in the *rpoB*, *katG* and *inhA* genes¹⁸⁻²². The GenoType MTBDRplus® (Hain Lifescience GmbH) molecular method allows rapid diagnosis of the clinical sample and detection of the most common mutations in these genes^{21,23}. The aim of our study was to determine the sensitivity of the MTBDRplus® assay in comparison to culture, identification and classic DST, directly from smear-positive clinical specimens.

Material and methods

Clinical samples studied

We studied smear-positive sputum samples of pulmonary tuberculosis patients. The samples were sent to the Public Health Laboratory – Mycobacteriology/Tuberculosis in 2007 and 2008. The specimens were handled using the N-acetyl-L-cysteine-NAOH decontamination method. The concentrated sediment was re-suspended in 1.0-2.0 mL of phosphate buffer (pH = 7.0) and the smears stained using Ziehl-Neelsen

se, durante 2007 e 2008. As amostras foram processadas segundo o método de descontaminação N-acetil-L-cisteína-NAOH. O sedimento concentrado foi ressuspenso em 1,0-2,0 mL de tampão fosfato (pH = 7,0) e os esfregaços foram corados usando os métodos de Ziehl-Neelsen e Auramina. Após inoculação dos meios de cultura, sólidos e líquidos, o sedimento restante da amostra descontaminada foi armazenado a -20°C. Foi efectuada identificação molecular da espécie de micobactéria em todas as culturas positivas e, nos casos em que se isolou o complexo *M. tuberculosis*, efectuou-se antibiograma de primeira linha. Os resultados nos métodos clássicos permitiram seleccionar 68 amostras com resultado de microscopia positiva e os sedimentos previamente armazenados foram utilizados para realizar o ensaio de detecção molecular de resistência à INH e RIF, com o MTBDRplus® (HAIN Lifescience).

Extracção do ADN

Para a extracção do ADN das amostras respiratórias descontaminadas centrifugaram-se cerca de 500 µL de cada uma das amostras durante 15 minutos a 13 000 x g. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspenso em 100 µL de água destilada. Esta suspensão foi, de seguida, colocada durante 15 minutos numa placa de aquecimento a 95°C e incubada num banho de água ultrassónico à temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos à velocidade máxima (13 000 x g) e os sobrenadantes guardados para as análises subsequentes.

Identificação da espécie

Para a identificação do complexo *M. tuberculosis* foi usado o método Accuprobe® (Gen-

and Auramina methods. After inoculation of culture, solid and liquid form, the remaining sediment of the decontaminated specimen was stored at -20°C. Molecular identification of the mycobacterial species in all positive cultures was performed. When the *M. tuberculosis* complex was isolated, a first line antibiogram was carried out. Results obtained using the classic methods allowed the selection of 68 smear-positive sputum samples. The stored sediment was used to carry out MTBDRplus® (HAIN Lifescience) assay to detect molecular resistance to INH and RIF.

DNA extraction

Around 500 µL of each specimen was centrifuged for 15 minutes at 13 000 x g to extract DNA from the decontaminated sputum samples. The excess was discarded and the sediment re-suspended in 100 µL of distilled water. This suspension was then placed for 15 minutes on a hot plate at 95°C and incubated in a bath of ultra-sonic water at room temperature for 15 minutes. Finally, the samples were centrifuged for 10 minutes at maximum speed (13 000 x g) and the excess stored for subsequent analyses.

Species identification

The *M. tuberculosis* complex was identified using the Accuprobe® (GenProbe Inc., San Diego, CA) method in accordance with the manufacturer's instructions.

Antibiogram

A first line antibiogram was performed on all *M. tuberculosis* complex isolates to eva-

Probe Inc., San Diego, CA), de acordo com instruções do fabricante.

Antibiograma

Todos os isolados do complexo *M. tuberculosis* foram sujeitos a antibiograma de primeira linha, onde se avaliaram as susceptibilidades/resistências à isoniazida (INH), rifampicina (RIF), estreptomicina (SM), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA), usando os sistemas automáticos BACTEC 460 TB (Becton & Dickinson, Microbiology Systems, Cockeysville, Md) ou BacT/ALERT MP Process (Biomérieux Inc., Durham, North Carolina), de acordo com instruções dos fabricantes.

GenoType MTBDRplus®

Uma vez que os resultados dos métodos clássicos de identificação e de antibiograma eram conhecidos, os testes MTBDRplus® foram efectuados “às cegas”, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, para a amplificação utilizámos 35µL da mistura primers (PNM, fornecida com o kit), 1X tampão da polimerase contendo 2,5 mM de MgCl₂, 5mM de MgCl₂, 1U de Taq polymerase e 5 µL do ADN extraído de cada uma das amostras, perfazendo o volume final a 50 µL com água destilada. O protocolo de amplificação consistiu numa fase inicial de desnaturação a 95°C durante 15 minutos, seguida de 10 ciclos de 30s a 95°C e 120s a 58°C; 30 ciclos adicionais de 30s a 95°C, 40s a 53°C e 40s a 70°C; e uma extensão final a 70°C durante 8 minutos.

Cada tira de teste MTBDRplus® contém 27 sondas, incluindo 6 controlos de amplificação e hibridação (CC, UC, TUB, *rpoB*, *katG* e *inhA*) que permitem verificar se o ensaio cor-

reponde a susceptibilidade/resistência to isoniazid (INH), rifampin (RIF), streptomycin (SM), ethambutol (EMB) and pyrazinamid (PZA), using the automated BACTEC 460 TB (Becton & Dickinson, Microbiology Systems, Cockeysville, MD) or BacT/ALERT MP Process (Biomérieux Inc., Durham, North Carolina) systems in accordance with the manufacturers' instructions.

Genotype MTBDRplus®

‘Blinded’ MTBDRplus® assay was performed once the results of the classic identification method and the antibiogram were known, in accordance with the manufacturer's instructions. In short, for the amplification we used 35µL of primer-nucleotide mix (PNM, supplied with the kit), 1X polymerase incubation buffer containing 2.5 mM of MgCl₂, 5mM of MgCl₂, 1U of Taq DNA polymerase and 5 µL of DNA extracted from each sample, in a final volume of 50 µL with distilled water. The amplification procedure consisted of an initial denaturation at 95°C for 15 minutes, followed by 10 cycles of 30 secs at 95°C and 120 secs at 58°C; 30 additional cycles of 30 secs at 95°C, 40 secs at 53°C and 40 secs at 70°C; and a final extension step at 70°C for 8 minutes.

Each assay strip of the MTBDRplus® assay contained 27 probes, including 6 amplification and hybridation controls (CC, UC, TUB, *rpoB*, *katG* and *inhA*) to verify test procedures. To detect resistance to RIF, there were 8 wild type pattern probes which ranged from the 504-533 region of the *rpoB* gene and 4 probes (MUT D516V, MUT H526Y, MUT H526D, and MUT S531L) for the more common mutations associated

reu de forma adequada. Para a detecção da resistência à RIF, existem oito sondas do tipo selvagem (WT – *wild type*) que abrangem a região 504-533 do gene *rpoB* e quatro sondas (MUT D516V, MUT H526Y, MUT H526D, e MUT S531L) para as mutações mais comuns associadas ao fenótipo resistente. Para a detecção da resistência à INH, analisaram-se os genes *katG* e *inhA*. Para o gene *katG* existe uma sonda do tipo selvagem para a região S315 e duas sondas (MUT T1 e MUT T2) para as mutações S315T. A região promotora do gene *inhA* compreende as regiões entre as posições 9 a 22 para a sonda do tipo selvagem 1 (WT1) e posições 1 a 12 para a sonda do tipo selvagem 2 (WT2). As sondas MUT1, MUT2, MUT3A e MUT3B permitem avaliar quatro mutações no gene *inhA* (15C/T, 16A/G, 8T/C e 8T/A). Ambas as resistências, à INH e à RIF, resultam na omissão de uma sonda do tipo selvagem (WT) ou no aparecimento de uma sonda mutante.

Resultados

O teste MTBDRplus® foi efectuado em 68 amostras respiratórias, com resultados de microscopia positivos. Simultaneamente, todas as amostras foram caracterizadas usando métodos bacteriológicos clássicos (Quadro I).

Os resultados de microscopia variaram entre 4 bacilos álcool ácido resistentes/100 campos e 10-99 bacilos álcool ácido resistentes /campo (3+).

Em todas as amostras a partir das quais se isolaram estirpes sensíveis aos antibióticos INH e RIF (63,2%), a análise directa da amostra descontaminada usando o teste MTBDRplus® permitiu apenas verificar a existência de padrões do tipo selvagem (WT), corroborando os resultados dos métodos clássicos. Da mes-

with resistant phenotypes. To detect resistance to INH, we analysed the *katG* and *inhA* genes. For the *katG* gene there was a wild type pattern probe for the S315 region and 2 probes (MUT T1 and MUT T2) for the S315T mutations. The promoter region of the *inhA* gene involves the regions between positions 9 - 22 for the wild type 1 (WT1) pattern probe and positions 1 - 12 for the wild type 2 (WT2) pattern probe. The MUT1, MUT2, MUT3A and MUT3B probes allowed evaluation of the 4 mutations of the *inhA* gene (15C/T, 16A/G, 8T/C and 8T/A). Both the resistances, to INH and RIF, result in the omission of a wild type pattern probe or the emergence of a mutant probe.

Results

The MTBDRplus® assay was performed on 68 smear-positive sputum samples. At the same time, all the specimens were characterised using classic bacteriology methods (Table 1).

Microscopic analysis results ranged from 4 acid-alcohol resistant bacilli/100 fields to 10 acid-alcohol resistant bacilli / (3+) field. In all specimens from which INH and RIF-susceptible strains were isolated (63.2%), direct analysis of the decontaminated specimen using the MTBDRplus® assay allowed verification of wild type patterns, corroborating the results gleaned using classic methods. Equally, the resistant strains isolated (36.8%) presented specific mutations corresponding to the respective phenotype, or lack of a wild type pattern probe, which, in accordance with the assay's instructions, also characterises a resistant isolate.

ma forma, as estirpes resistentes isoladas (36,8%) apresentaram mutações específicas correspondentes ao respectivo fenótipo, ou ausência de uma das sondas do tipo selvagem, que, de acordo com instruções do próprio teste, também caracteriza um isolado resistente. Das estirpes resistentes, 32,3% (22/68) eram multirresistentes, 2,9% (2/68) monorresistentes à INH e 1,5% (1/68) monorresistentes à RIF. Relativamente à resistência à INH (multi e monorresistência) verificou-se, tal como era esperado, mutações predominantemente na região promotora do gene *inhA*: 16,7% apresentaram mutação no gene *katG* (MUT1) e 87,5% no gene *inhA* (95,2% MUT1; 4,8% MUT2). Todas as estirpes/amostras multirresistentes apresentaram mutações no gene *rpoB* (91,3% MUT3; 4,3% MUT2A, 2B, 3) e a estirpe monorresistente à RIF não apresentou nenhum padrão de mutação, mas ausência de uma banda do tipo selvagem.

Conclusões

De acordo com o presente estudo, verificou-se que, para amostras com resultados de baciloscopia superiores a 4 bacilos álcool-ácido resistentes/100 campos, o teste rápido de detecção de multirresistência apresenta uma sensibilidade de 100%, permitindo detectar em todos os casos os fenótipos correctos, comparativamente aos resultados dos métodos clássicos. Esta elevada sensibilidade deve-se, sobretudo, à existência de regiões genéticas específicas que permitem detectar mutações que conferem resistência nas estirpes de *M. tuberculosis* isoladas em Portugal. De facto, e contrariamente ao que está descrito para a maioria dos países europeus, em Portugal, a resistência à INH está fundamentalmente associada a mutações na região promotora

32.3% (22/68) of the resistant strains were multiresistant, 2.9% (2/68) monoresistant to INH and 1.5% (1/68) monoresistant to RIF. In terms of multi and monoresistance to INH, mutations predominantly in the promoter region of the *inhA* gene, 16.7% presenting mutation in the *katG* gene (MUT1) and 87.5% in the *inhA* gene (95.2% MUT1; 4.8% MUT2) were seen, as expected. All the multiresistant strains/samples showed mutation in the *rpoB* gene (91.3% MUT3; 4.3% MUT2A, 2B, 3) and the strain monoresistant to RIF did not present a mutation pattern, but lack of a wild type pattern band.

Conclusions

Our study shows that for specimens with smear results higher than 4 acid-alcohol resistant bacilli/100 fields, the MTBDRplus® assay had a 100% sensitivity, allowing detection of the correct phenotypes in all cases, always in agreement with classic methods.

This high sensitivity is due primarily to the existence of specific genetic regions which allow the detection of mutations which confirm resistance in the *M. tuberculosis* strains isolated in Portugal. In Portugal, unlike the majority of European countries, resistance to INH is fundamentally associated to mutations in the promoter region of the *inhA* and not the *katG* gene. Research into mutations in this gene allowed detection of a greater number of cases resistant to INH which previously could have presented false negatives.

Recent studies into the MTBDRplus® assay also show high sensitivity and sensibility rates^{21,23}.

Quadro I – Resultados obtidos com o GenoType MTBDRplus® e com os métodos clássicos

Amostra	Baciloscopia	TSA	MTBDR	Isoniazida		Rifampicina
				<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>rpoB</i>
1	5B/100 CAMPOS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
2	5B/100 CAMPOS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
3	5B/100 CAMPOS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
4	5B/100 CAMPOS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
5	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
6	1+	MR	MR	WT	MUT2	MUT2A,2B,3
7	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
8	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
9	2+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
10	5B/100 CAMPOS	INH	INH	WT	MUT1	WT
11	5B/100 CAMPOS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
12	6B/100 CAMPOS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
13	5B/100 CAMPOS	MR	MR	MUT1	MUT1	MUT3
14	2+	RIF	RIF	WT	WT	sem WT7
15	4B/100 CAMPOS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
16	5B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
17	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
18	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
19	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
20	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
21	5B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
22	5B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
23	5B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
24	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
25	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
26	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
27	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
28	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
29	5B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
30	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
31	8B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
32	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
33	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
34	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
35	5B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
36	3+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
37	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
38	5B/100 CAMPOS	MR	MR	MUT1	WT	MUT3
39	5B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
40	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
41	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
42	2+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
43	2+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
44	8B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
45	5B/100 CAMPOS	INH	INH	MUT1	WT	WT
46	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
47	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
48	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
49	4B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
50	8B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
51	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
52	1+	MR	MR	MUT1	WT	MUT3
53	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
54	4B/100 CAMPOS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
55	8B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
56	2+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
57	2+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
58	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
59	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
60	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
61	4B/100 CAMPOS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
62	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
63	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
64	2+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
65	3+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
66	1+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
67	3+	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT
68	6B/100 CAMPOS	SENSÍVEL	SENSÍVEL	WT	WT	WT

MR – Multirresistente; INH – Resistente à INH; RIF – Resistente à RIF; WT – Wild Type (sensível); *katG* MUT1 – mutação S315T; *inhA* MUT1 – mutação -15C/T; *inhA* MUT2 – mutação -16A/G; *rpoB* MUT2A – mutação H526Y; *rpoB* MUT2B – mutação H526D; *rpoB* MUT3 – mutação S531L

TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE: DETECÇÃO DIRECTA EM AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS
 COM O MÉTODO DE GENÉTICA MOLECULAR MTBDRPLUS®

Rita Macedo, António Amorim, Edna Pereira

Table I – Results obtained with GenoType MTBDRplus® assay and classic methods

Sample	Smear	TSA	MTBDR	Isoniazid		Rifampin
				katG	inhA	rpoB
1	5B/100 FIELDS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
2	5B/100 FIELDS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
3	5B/100 FIELDS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
4	5B/100 FIELDS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
5	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
6	1+	MR	MR	WT	MUT2	MUT2A,2B,3
7	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
8	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
9	2+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
10	5B/100 FIELDS	INH	INH	WT	MUT1	WT
11	5B/100 FIELDS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
12	6B/100 FIELDS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
13	5B/100 FIELDS	MR	MR	MUT1	MUT1	MUT3
14	2+	RIF	RIF	WT	WT	no WT7
15	4B/100 FIELDS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
16	5B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
17	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
18	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
19	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
20	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
21	5B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
22	5B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
23	5B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
24	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
25	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
26	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
27	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
28	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
29	5B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
30	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
31	8B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
32	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
33	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
34	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
35	5B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
36	3+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
37	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
38	5B/100 FIELDS	MR	MR	MUT1	WT	MUT3
39	5B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
40	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
41	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
42	2+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
43	2+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
44	8B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
45	5B/100 FIELDS	INH	INH	MUT1	WT	WT
46	1+	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
47	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
48	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
49	4B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
50	8B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
51	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
52	1+	MR	MR	MUT1	WT	MUT3
53	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
54	4B/100 FIELDS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
55	8B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
56	2+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
57	2+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
58	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
59	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
60	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
61	4B/100 FIELDS	MR	MR	WT	MUT1	MUT3
62	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
63	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
64	2+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
65	3+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
66	1+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
67	3+	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT
68	6B/100 FIELDS	SENSITIVE	SENSITIVE	WT	WT	WT

MR – Multiresistant; INH – INH resistant; RIF – RIF resistant; WT – Wild type pattern (sensitive); katG MUT1 –S315T mutation; inhA MUT1 – -15C/T mutation; inhA MUT2 – -16A/G mutation; rpoB MUT2A –H526Y mutation; rpoB MUT2B –H526D mutation; rpoB MUT3 –S531L mutation

do gene *inhA* e não no gene *katG*. A introdução da pesquisa de mutações neste gene possibilitou a detecção de um maior número de casos resistentes à INH, que anteriormente poderiam originar falsos negativos. Estudos recentes sobre o teste MTBDRplus® demonstraram também elevadas taxas de sensibilidade e especificidade^{21,23}.

Concluindo, podemos afirmar que o teste MTBDRplus® é um método rápido, de execução simples e de grande sensibilidade na detecção de tuberculose multirresistente directamente a partir de amostras respiratórias. Esta constatação torna a sua inclusão na rotina do diagnóstico laboratorial um contributo essencial no controlo da tuberculose.

We conclude by saying that the MTBDRplus® assay is a rapid, user-friendly and highly sensitive test for detecting multidrug-resistant tuberculosis directly from sputum samples, making its inclusion in routine laboratory diagnosis an essential contribution to tuberculosis control.

Bibliografia/Bibliography

1. World Health Organization. 2006. Guidelines for the programmatic management of drug resistant tuberculosis. WHO/HTM/TB/2006.361. Geneva: World Health Organization.
2. SVIG-TB, Direcção-Geral da Saúde. Ponto da situação epidemiológica e de desempenho em 2007, dados preliminares. 2007.
3. World Health Organization. Antituberculous drug resistance in the World, Report number 3, 2005.
4. Aziz MA, Wright A, Laszlo A, de Muynck A, Portaels F, van Deun A, Wells C, Nunn P, Blanc L, Raviglione M. Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance) an updated analysis. *Lancet* 2006; 368: 2142-2154.
5. Kochi A, Vareldzis B, Styblo K. 1993. Multidrug-resistant tuberculosis and its control. *Res Microbiol* 1993; 144: 104-110.
6. Raviglione MC, Smith MB. XDR Tuberculosis – Implications for global public health. *N Engl J Med* 2007; 356: 656-659.
7. World Health Organization. Addressing the threat of tuberculosis caused by extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* (XDR-TB). *Weekly Epidemiological Record* 2006; 81: 385-396.
8. Parsons LM, Somoskövi A, Urbanczik R, Salfinger M. Laboratory diagnostic aspects of drug resistant tuberculosis. *Front Biosci* 2004; 9: 2086-2105.
9. Coll P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 299-308.
10. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* 2001; 2: 164-168.
11. Shoeb HA, Bowman Jr BU, Ottolenghi AC, Merola AJ. Evidence for the generation of active oxygen by isoniazid treatment of extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 404-407.
12. Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* 2002; 70: 4955-4960.
13. Li Z, Kelley C, Collins F, Rouse D, Morris S. Expression of *katG* in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *J Infect Dis* 1998; 177: 1030-1035.
14. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs Jr WR. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994; 263: 227-230.
15. Macedo R, Perdigão J, Portugal I, Brum L. MDR-TB in Lisbon area: data report from 2004 to 2006. 28th Annual Congress of European Society of Mycobacteriology (Abstract book), 2007:37.

16. Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, Viljanen MK, Soini H. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2006; 44:350-352.
17. Piersimoni C, Olivieri A, Benacchio L, Scarparo C. Current perspectives on drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex: the automated nonradiometric systems. J Clin Microbiol 2006; 44: 20-28.
18. Bang D, Bengård Andersen A, Thomsen VØ. Rapid genotypic detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly in clinical specimens. J Clin Microbiol, 2006; 44:2605-2608.
19. 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; 44:2338-2342.
20. 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; 43:3699-3703.
21. Miotto P, Piana F, Penati V, Canducci F, Migliori GB, Cirillo DM. Use of genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. J Clin Microbiol, 2006; 44: 2485-2491.
22. Somoskovi A, Dormandy J, Mitsani D, Rivenburg J, Salfinger M. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. J Clin Microbiol 2006; 44:4459-4463.
23. Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. J Clin Microbiol 2007; 45:2635-2640.