



AVALIAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTE À ISONIAZIDA

Jéssica dos Santos Bandeira¹
Graziele Lima Bello²
Franciele Costa Leite Morais³
Fernanda Rolim⁴
Maria Lucia Rossetti⁵

Resumo

Entre as doenças infecciosas, a tuberculose (TB) é considerada uma das mais prevalentes e com altas taxas de mortalidade. O panorama é ainda mais complicado pelo aumento das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes aos principais fármacos utilizados no tratamento anti-TB. O diagnóstico precoce e a identificação dos principais genes de resistência são considerados os fatores mais importantes para o controle da doença. O objetivo deste estudo foi padronizar e avaliar o uso da genotipagem por PCR em tempo real para identificar as principais mutações envolvidas na resistência à isoniazida - INH (*katG* 315 G/C e *inhA* -15 C/T). Para a realização da PCR em tempo real foram analisadas 55 amostras de DNA extraído de cultura de *M. tuberculosis* resistente à INH, previamente caracterizadas por sequenciamento. A concordância entre os testes (PCR em tempo real *versus* sequenciamento) foi, para o alvo *katG*, o índice Kappa de 0,89. A sensibilidade e especificidade foram 97 e 91%, respectivamente. Para *inhA*, o índice de Kappa foi de 0,91, a sensibilidade e especificidade foram 94 e 97%, respectivamente. A análise da curva ROC mostrou a área sob a curva (AUC) de 0,94 para *katG* e 0,96 para *inhA* (para ambas as avaliações, a AUC apresentou significância estatística de $p < 0,001$). Concluiu-se que a genotipagem por PCR em tempo real é um bom método para identificar as principais mutações envolvidas na resistência à INH, assim como pode ser uma alternativa ao sequenciamento.

Palavras chave: Resistência à Isoniazida, Genotipagem, PCR em Tempo Real, *M. tuberculosis*

1 Aluno do curso de graduação Biomedicina – Bolsista CNPq – jessibandeira@hotmail.com

2 Doutoranda em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – Bolsista CAPES – graziebell@hotmail.com

3 Mestranda em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde - clmorais.fran@gmail.com

4 Aluno do curso de graduação Farmácia – Bolsista FAPERGS – fernandarolim97@gmail.com

4 Docente dos cursos de graduação em Biomedicina/Farmácia e PPGBiosaúde - mrosset@terra.com.br

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) resistente a medicamentos tem aumentado em todo o mundo, exigindo o desenvolvimento de novos testes de detecção de resistência. As principais drogas usadas no tratamento de primeira linha da TB são a isoniazida (INH) e a rifampicina (RIF), e a resistência a ambas às drogas configura-se em casos de tuberculose multidroga resistente (TB- MDR). Até recentemente, a RIF era considerada como um marcador de TB-MDR, visto que, frequentemente essa resistência está associada à resistência à INH. Há estudos recorrentes que mostram o agente *Mycobacterium tuberculosis* resistente à INH e sensível à RIF; significando um fator de risco para pobres desfechos (GARCIA-PRATS et al., 2016; DHEDA et al., 2017).

A monorresistência à INH apresentou uma média global, em 2014, de 9,5% de novos casos e 14% de casos de TB previamente tratada. No entanto, testes de rotina para a identificação da resistência à INH não são usados como testes de primeira escolha na maioria dos casos (DHEDA et al., 2017). Em geral, mutações que conferem resistência à INH ocorrem nos genes *katG* e *inhA* e são encontradas em 75-85% dos isolados resistentes a esse fármaco (PERIZZOLO et al., 2012, JAGIELSKI et al., 2014, SEIFERT et al., 2015). A mutação mais comum no gene *katG* surge no códon 315 pela substituição do aminoácido serina (AGC) pela treonina (ACC), com diminuição da ação da catalase, importante para ativação do fármaco (SILVA; PALOMINO, 2011). Em vários estudos em todo o mundo, a frequência de cepas resistentes à INH varia de 50 a 100%, com a mutação no códon 315 do gene *katG* (HILLERMANN et al., 2005, ZHANG et al., 2005, VAN DOORN et al., 2006).

O gene *inhA* codifica a proteína transportadora de ácido graxo enoil-ACP redutase (NADH), que é essencial na síntese de ácidos micólicos da parede celular da bactéria. A mutação do gene *inhA* modifica a enzima, que perde afinidade pelo NADH, resultando em resistência à INH (SIQUEIRA et al., 2009).

Tendo em vista a necessidade de mais estudos sobre a identificação de resistência à INH e o desenvolvimento de tecnologias mais custo-efetivas, este estudo teve como objetivo desenvolver, padronizar e avaliar dois ensaios de genotipagem por PCR em tempo real (ensaio *Taqman*) para detecção de marcadores de resistência à INH com DNA extraído da cultura *M. tuberculosis*.

METODOLOGIA

Utilizou-se um banco de amostras de DNA extraído de cultura de *M. tuberculosis* (de acordo com o descrito por Van Soolingen et al.(1994). As amostras foram armazenadas à -80°C no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Secretaria Estadual de Saúde (SES), localizado na cidade de Porto Alegre, RS. A reação de amplificação foi realizada em termociclador de PCR em tempo real (*StepOne Real-Time PCR Systems - AB Applied Biosystem*). A reação foi padronizada em um volume total de 20 µL, contendo 10 µL da master mix Kapa, 1 µL de solução de primers e sondas (*AB Applied Biosystems*) na concentração de 20X. Foram adicionados 2µL (10ng/µL) de DNA na mistura. O controle do tipo selvagem (WT) foi definido a partir do DNA da cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv. Como controle de negativo da reação, foi utilizada água ultrapura livre de nucleases. Estes foram ensaios customizados pela empresa *Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific* (ensaios de genotipagem SNP 4332077-Custom TaqMan não humanos, SM).

Os dados foram analisados utilizando o *Microsoft® Excel 2016* e *IBM® SPSS®* (versão 21.0). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Saúde Pública / Secretaria de Saúde do ESP/SES/RS (número de aprovação: 1.607.182).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio foi padronizado a partir de amostras de DNA extraídas da cultura de *M. tuberculosis*. Este DNA foi quantificado a 100 ng/µL e diluído a 10 ng/µL. A análise dos resultados foi realizada com uma ferramenta oferecida pelo fabricante: *Thermo Fisher Cloud*.

Genotipagem do gene *katG* (315 G/C): Dos 55 DNAs extraídos de amostras resistentes à INH, foram detectados 43 mutantes (MUT) e 12 WT na região do gene, de acordo com a caracterização por sequenciamento. A genotipagem por PCR em tempo real detectou 42 amostras de MUT (42/43) e 11 WT (11/12) (uma amostra falso positiva e uma falso negativa). O valor de concordância do índice Kappa foi de 0,89. A sensibilidade e especificidade foram 97, 91%, respectivamente. A área acima da curva (AUC) foi de 0,94.

Genotipagem do gene *inhA* (-15 C/T): A partir de 55 DNAs extraídos, o sequenciamento identificou 18 amostras de MUT e 37 de WT. A genotipagem por PCR em tempo real identificou 17 amostras MUT e 36 WT (um falso positivo e um falso negativo). O valor do índice Kappa foi de 0,91 (concordância considerada excelente). Sensibilidade e especificidade foram 94 e 97%, respectivamente. A curva ROC apresentou AUC de 0,96.

A falha em identificar um isolado resistente à INH é equivalente a perder a eficácia de uma das drogas e comprometer o regime básico de tratamento. Os genes mais utilizados como marcadores, segundo estudos, como uma recente revisão sistemática (SEIFERT et al., 2015), que avaliou 11.411 isolados de *M. tuberculosis* em 49 países (janeiro de 2000 a agosto de 2013), são o *katG* (315 G / C) e a região promotora do *inhA* (-15 C/T). Embora o uso de sequenciamento seja considerado o padrão ouro para detecção de resistência, estudos recentes mostraram que o uso da genotipagem por PCR em tempo real é amplamente utilizado em diagnósticos moleculares e em estudos de identificação de perfis de resistência, devido à sua especificidade, alto grau de automação e boa reprodutibilidade (DARBAN-SAROKHALIL et al., 2013, SEAGAR; NEISH; LAURENSEN, 2017).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelo método proposto indicam que testes moleculares podem ser usados para a detecção rápida de TB resistente a medicamentos, com alta precisão.

REFERÊNCIAS

CHAKRAVORTY, S.; SIMMONS, A.M.; ROWNEKI, M.; PARMAR, H.; CAD, Y.; et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. **MBio.**, p. 1-12, 2017.

DHEDA, K.; GUMBO, T.; MAARTENS, G.; E DOOLEY, K.; MCNENEY, R.; et al. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. **Lancet Respir Med.**, p.1-70, 2017.

GARCIA-PRATS, A. J.; DU PLESSIS, L.; DRAPER, H.R.; BURGER, A.; SEDDON, J.A.; et al. Outcome of culture-confirmed isoniazid-resistant rifampicin-susceptible tuberculosis in children. **Int J Tuberc Lung Dis.**, v. 20, p.1469–1476, 2016.

HILLEMANN, D.; KUBICA, T.; AGZAMOVA, R.; VENERA, B.; RUSH-GERDER, S.; et al. Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan. **Int J Tuberc Lung Dis.**, v. 9, p.1161-1167, 2005.

JAGIELSKI, T.; BAKULA, Z.; ROESKE, K.; KAMINSKI, M.; NAPIORKOWSKA, A.; et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **J Antimicrob Chemother.**, v.69, n.9, p.2369-2375, 2014.

PERIZZOLO, P. F.; DALLA COSTA, E. R.; RIBEIRO, A. W.; SPIES, F.S.; RIBEIRO, M.O.; et al. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. **Tuberculosis.** v.92, p.56-59, 2012.

SEAGAR, A.; NEISH, B.; LAURENSEN, I. F.; Comparison of two in-house real-time PCR assays with MTB Q-PCR Alert and GenoType MTBDR plus for the rapid detection of mycobacteria in clinical specimens. **Journal of Medical Microbiology**, v. 6110, p.1459–1464, 2012

SEIFERT, M.; CATANZARO, D.; CATANZARO, A.; RODWELL, T.C.; et al. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review. **PLoS One**. p. 1–13, 2015.

SILVA, PEA.; PALOMINO, JC.; Molecular basis and mechanisms of drug resistance in 24 *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n.7, p.1417-1430, 2011.

SIQUEIRA, H. R.; Freitas, F. A. D.; OLIVEIRA, D. N.; et al. Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida por mutações em duas regiões diferentes do gene katG. **J Bras Pneumol.**, v. 35, n.8, p.773-779, 2009.

VAN, DOORN H. R.; DE HAAS, P. E.; KREMER, K.; VANDENBROUCKE-GRAUS, C.M.J.E.; BORGDORFF, M.W.; et al. Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino-acid position 315 of katG: a decade of experience in The Netherlands. **Clin Microbiol Infect.**, v. 12, p.769-775, 2006.

VAN SOOLINGEN, D.; HAAGSMA, J.; HERMANS, P.W.; et al. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 10, p. 2425-33, Oct 1994.

VERZA, M.; MACHMANN R. A.; SILVA, M. S. N.; COSTA, E.R.D.; RIBEIRO, M.O.; et al. In house colorimetric reverse hybridisation assay for detection of the mutation most frequently associated with resistance to isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** , v.104: p.710-714, 2009

ZHANG, M.; YUE, J.; YANG, Y. P.; ZHANG, H.; LEI, J.; et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. **J Clin Microbiol.**, v.43, p. 5477-5482, 2005.

ZHANG. Y; TELENTI, A.; Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Hatfull GF, Jacobs WR-Jr. **Molecular of mycobacteria**. Washington (DC): ASM Press.; p.235-254, 2000.