



# Ensaio de sondas em linha para a deteção de tuberculose resistente a medicamentos

Guia de interpretação e elaboração  
de laudos para pessoal de  
laboratório e clínicos



# Ensaio de sondas em linha para a deteção de tuberculose resistente a medicamentos

Guia de interpretação e elaboração  
de laudos para pessoal de  
laboratório e clínicos



---

# Índice

Abreviaturas	v
Glossário	vi
Agradecimentos	vii
Sobre este guia	viii
<b>Introdução</b>	1
Princípio do ensaio de sonda em linha	2
GenoType MTBDR <i>plus</i> Versão 2	3
GenoType MTBDR <i>s</i> / Versão 2	4
Interpretação e elaboração de laudos de ensaios de sondas em linha	4
Revisão das interpretações do fabricante	5
Ações de diagnóstico adicionais de seguimento para conduzir um tratamento adequado da TB	8
<b>Interpretação do ensaio de sondas em linha (LPA) de primeira linha (PL)</b>	10
Rifampicina	10
Isoniazida	12
<b>Interpretação do ensaio de sondas em linha (LPA) de segunda linha (SL)</b>	14
Fluoroquinolonas	14
Injetáveis de segunda linha	18
<b>Guia de avaliação de casos de TB resistente a medicamentos com base em LPA-SL</b>	20
<b>Referências</b>	27
<b>Anexo 1.</b> Formato de laudos LPA-PL – Exemplos práticos	31
<b>Anexo 2.</b> Formato de laudos LPA-SL – Exemplos práticos	32
<b>Anexo 3.</b> Alterações nucleotídicas específicas detetadas por sondas MUT	34

---

## Abreviaturas

<b>Am</b>	amicacina
<b>PCC</b>	ponto de corte clínico
<b>CC</b>	concentração crítica
<b>CIM</b>	concentração inibitória mínima
<b>Cm</b>	capreomicina
<b>Eto</b>	etionamida
<b>FQ</b>	fluoroquinolona
<b>H</b>	isoniazida
<b>ISL</b>	(medicamento) injetável de segunda linha (ou seja, canamicina, amicacina, capreomicina)
<b>Km</b>	canamicina
<b>Lfx</b>	levofloxacina
<b>LPA</b>	ensaio de sonda em linha
<b>LPA-PL</b>	ensaio de sonda em linha – primeira linha
<b>LPA-SL</b>	ensaio de sonda em linha – segunda linha
<b>NTM</b>	micobactérias não tuberculosas
<b>Mfx</b>	moxifloxacina
<b>MTBC</b>	complexo Mycobacterium tuberculosis
<b>MUT</b>	sonda de mutação
<b>Pto</b>	protionamida resistente
<b>RDRQ</b>	região determinante de resistência às quinolonas
<b>RDRR</b>	região determinante de resistência à rifampicina
<b>Rif</b>	rifampicina sensível
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>TB</b>	tuberculose
<b>TSA</b>	teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
<b>TB-MDR</b>	tuberculose multirresistente
<b>WT</b>	tipo selvagem

---

## Glossário

**Concentração crítica (CC):** a menor concentração *in vitro* de um agente anti-TB que inibe o crescimento de 99% das estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) fenotipicamente selvagens.

**Ponto de corte clínico (PCC):** concentração(ões) de um agente antimicrobiano que define uma concentração inibitória mínima (CIM) acima da CC, a qual separa as estirpes que provavelmente responderão ao tratamento daquelas que provavelmente não responderão. Esta concentração é determinada por múltiplas variáveis, tanto variáveis *in vivo*, como a correlação com dados dos desfechos clínicos disponíveis e dados PK/PD, incluindo a dose do medicamento, bem como as distribuições das CIM e marcadores genéticos. O agente antimicrobiano pode ser eficaz contra a resistência observada com doses menores, aumentando-se a sua dosagem até à máxima tolerada, desta forma atingindo um ponto de corte clínico mais elevado a partir do qual não se recomenda a utilização desse medicamento em particular. O ponto de corte clínico é usado para orientar, caso a caso, decisões clínicas relativas ao tratamento do paciente.

**Concentração inibitória mínima (CIM):** a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de mais de 99% de um microorganismo num teste de suscetibilidade (TSA) em meio sólido ou diluição em caldo.

Normalmente, quando se agregam as CIM testadas com um método normalizado para uma espécie, tem-se uma única distribuição de Gauss, o que corresponde à distribuição do tipo fenotipicamente selvagem (pWT) para essa espécie (ou seja, a distribuição para organismos que não têm mecanismos de resistência fenotipicamente detetáveis). Por vezes, são identificadas distribuições adicionais com CIM geralmente mais elevadas, correspondendo a organismos intrínseca ou naturalmente resistentes (ou seja, distribuição do tipo fenotipicamente não selvagem).

---

# Agradecimentos

O presente guia foi redigido pelo grupo principal da *Global Laboratory Initiative* (GLI). A elaboração foi dirigida e concluída por Elisa Tagliani e Daniela Cirillo (Instituto Científico San Raffaele), com contribuições de Elisa Ardizzoni, Bouke de Jong e Leen Rigouts (Institute of Tropical Medicine Antwerp). Agradecemos de modo especial aos membros do grupo principal da GLI por suas amplas contribuições, nomeadamente Heather Alexander, Tubi Abiola Olajumoke, Maka Akhalaia, Heidi Albert, Uladzimir Antonenka, Martina Casenghi, Petra de Haas, Kathleen England, Lucilaine Ferrazoli, Marguerite Massinga Loembe, Alaine Umubyeyi Nyaruhirira, Daniel Orozco, Kaiser Shen, Thomas Shinnick, Alena Skrahina, Sabira Tahseen e Hung Van Nguyen. Durante a finalização deste guia, contamos com os esforços de coordenação e os significativos contributos técnicos de Dennis Falzon, Christopher Gilpin, Lice González-Angulo, Alexei Korobitsyn, Fuad Mirzayev e Karin Weyer, do Programa Global contra a Tuberculose da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Agradecemos também o feedback dado pelos seguintes parceiros e partes interessadas: Ignacio Monedero-Recuero, da *Global Drug-Resistant TB Initiative*; Paolo Miotto (Instituto Científico San Raffaele); Claudio Köser (Universidade de Cambridge); Natalia Shubladze (membro do grupo principal de ELI) e Soudeh Ehsani, do Escritório Regional para a Europa da OMS.

Os autores tomaram todas as precauções razoáveis para verificar as informações contidas nesta publicação. No entanto, o material publicado é distribuído sem garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita. É da responsabilidade do leitor interpretar e usar o material. Em caso algum poderão os autores ser responsabilizados por danos decorrentes do seu uso.

GLI é um grupo de trabalho da Parceria Stop TB. A elaboração e a publicação deste documento foram possíveis graças ao apoio financeiro da Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional.

Tradução: Apostroph Group. Revisão: Lucilaine Ferrazoli.

A imagem da capa é autoria de © Alicephotography. O layout e o design deste guia foram fornecidos por minimum graphics.

---

## Sobre este guia

O presente documento foi elaborado com o intuito de proporcionar uma orientação prática para a interpretação dos ensaios de sondas em linha (LPA) de primeira linha (PL) e segunda linha (SL) mais usados (ou seja, ensaios GenoType MTBDR*plus* V2.0 e GenoType MTBDRs/ V2.0; Hain Lifescience, Alemanha). Além da interpretação das mutações identificadas pelos dois ensaios, este guia inclui recomendações práticas sobre ações adicionais de diagnóstico que devem ser realizadas na presença de mutações específicas e as implicações clínicas que essas mutações têm na seleção de regimes adequados de tratamento da tuberculose (TB).

Este guia destina-se a fornecer informações tanto ao pessoal de laboratório como aos clínicos sobre:

- a associação das mutações específicas detetadas pelo teste com resistência fenotípica aos medicamentos;
- os casos em que não são identificadas mutações específicas que confirmam resistência e em que só é possível inferir a resistência;
- as implicações clínicas das mutações específicas detetadas pelos ensaios.

Além disso, o guia fornece apoio específico ao pessoal dos laboratórios de referência nacionais e regionais de TB no sentido de melhor perceber e gerir as eventuais discrepâncias entre os TSA fenotípico e genotípico.

Este guia descreve as mutações identificadas pelos testes de LPA-PL e SL incluindo informações relacionadas com a sua associação à resistência fenotípica a medicamentos, tendo por base o trabalho publicado por Miotto et al. (1), e com a CIM dos medicamentos de primeira e segunda linha conforme recentemente publicado pela OMS (2, 3). Inclui também a interpretação dos testes LPA, testes de diagnóstico adicionais de seguimento e as implicações clínicas relacionadas com a presença de mutações específicas, bem como as implicações clínicas nos casos em que a resistência é inferida.

Por último, este guia recorre a estudos de casos para demonstrar a forma como a informação deve ser comunicada aos clínicos, apresentando exemplos de resultados de LPA e um modelo recomendado para a elaboração de laudos de resultados.

---

# Introdução

Nas duas últimas décadas, a melhor compreensão da base molecular da resistência aos medicamentos resultou na profusão de métodos genotípicos para a rápida determinação da sensibilidade e resistência a medicamentos contra a TB. Além da rapidez do diagnóstico, os testes moleculares têm vantagens adicionais, como a possibilidade de aplicação direta em amostras clínicas (sem necessidade do isolamento da bactéria em cultura sólida ou líquida) e em amostras que contenham bactérias não viáveis (por exemplo, bactérias mortas pelo calor ou por inativação química), o potencial de elevada produtividade e a redução dos requisitos de biossegurança nos laboratórios.

Em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) endossou a utilização do LPA-PL-GenoType MTBDR*plus* (designado GenoType MTBDR*plus* V1), para a detecção rápida de TB multirresistente (TB-MDR) (4). Posteriormente, foram desenvolvidas novas versões da tecnologia de LPA incluindo (i) o GenoType MTBDR*plus* versão 2 (designado GenoType MTBDR*plus* V2) e (ii) o kit de detecção 2 Nipro NTM+MDRTB (designado «Nipro», Tóquio, Japão). Estas novas versões de LPA apresentam maior sensibilidade para detecção do MTBC e da resistência à rifampicina (Rif) e à isoniazida (H). Em 2015, a FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics) avaliou os LPA Nipro e GenoType MTBDR*plus* V2 e comparou-os com o GenoType MTBDR*plus* V1. O estudo demonstrou a equivalência entre estes três LPA comercialmente disponíveis para detecção de TB e da resistência à Rif e H (5).

O primeiro LPA comercial para a detecção de resistência a medicamentos contra a TB de segunda linha foi o GenoType MTBDR*s/* versão 1.0, desenvolvido há uma década pela Hain Lifescience (designado GenoType MTBDR*s/* V1). Em 2015, foi disponibilizada uma nova versão deste ensaio (GenoType MTBDR*s/* V2), que deteta as mutações associadas à fluoroquinolona e a resistência a medicamentos injetáveis de segunda linha (ISL) detetada pela versão 1.0, bem como mutações adicionais (descritas na secção infra).

No ano seguinte, a OMS divulgou recomendações sobre a utilização dos LPA-PL disponíveis comercialmente (ou seja, GenoType MTBDR*plus* V1, GenoType MTBDR*plus* V2 e Nipro) como teste inicial em substituição dos TSA fenotípicos para detetar resistência à Rif e H (6). Em 2016, a OMS também emitiu recomendações de utilização do GenoType MTBDR*s/* (V1 e V2) para detetar a resistência às fluoroquinolonas e aos medicamentos ISL em pacientes com TB Rif resistente/MDR e dar orientações quanto ao início de um regime de tratamento adequado da TB-MDR (7).

Para uma descrição mais pormenorizada do posicionamento dos LPA-PL e SL dentro dos algoritmos de diagnóstico de TB, consultar o documento da *Global Laboratory Initiative* (GLI) intitulado GLI model TB diagnostic algorithms (atualizado em junho de 2018) (8).

O objetivo deste documento, que se centra nos dois LPA mais usados (ou seja, GenoType MTBDR<sub>plus</sub> V2 e GenoType MTBDRs/ V2), é proporcionar orientação ao pessoal de laboratório e aos clínicos em relação à interpretação dos resultados de LPA-PL e SL e melhor perceber e gerir as eventuais discrepâncias entre os TSA fenotípicos e genotípicos.

### Princípio do ensaio de sonda em linha

Os LPA são testes baseados em fitas contendo ADN que determinam o perfil de resistência a medicamentos de estirpes do MTBC por meio do padrão de ligação dos amplicons (produtos da amplificação do ADN) com sondas das mutações mais comuns associadas à resistência a agentes de primeira e segunda linha e com sondas da sequência de ADN do tipo selvagem (WT) correspondente.

Os LPA são ensaios aprovados pela OMS para deteção rápida da resistência a agentes de primeira e segunda linha. Podem ser usados para testar isolados em cultura (teste indireto), bem como amostras clínicas (teste direto) com baciloscopia positiva (LPA-PL) e amostras de escarro com baciloscopias positivas e negativas (LPA-SL) (6, 7).

As mutações são detetadas (i) pela ligação dos amplicons com sondas das mutações mais comuns (sondas MUT) ou (ii) inferidas pela ausência de hibridação (ou seja, ausência de ligação) dos amplicons com as sondas WT correspondentes.

Uma reação após a hibridação deteta a ligação das sondas pela coloração das bandas na fita de teste.

### *É importante recordar que, à semelhança de outros testes rápidos atualmente endossados pela OMS, os LPA têm algumas limitações:*

- Embora o LPA detete as mutações identificadas com maior frequência em estirpes resistentes, algumas mutações que conferem resistência estão fora das regiões cobertas pelo teste. Nestes casos, a resistência não pode ser totalmente excluída, mesmo na presença de todas as sondas WT. Assim, nalguns casos, poderá ser necessário realizar TSA fenotípicos para obtenção de uma avaliação completa.
- Algumas mutações são identificadas especificamente por sondas MUT, enquanto outras são apenas inferidas pela ausência de ligação dos amplicons com sondas WT. A ausência de ligação de uma sonda WT sem ligação simultânea de uma sonda de mutação ocorre provavelmente pela presença de uma mutação de resistência. Contudo, é possível que ocorram erros sistemáticos devido a mutações sinónimas e não-sinónimas (p. ex., mutações filogenéticas). Embora, seja um evento raro (<1% dos isolados), pode ocorrer com maior frequência em alguns locais (9).
- O LPA é menos eficiente do que os TSA convencionais baseados em culturas para deteção de resistência em amostras que contenham bactérias sensíveis e resistentes a medicamentos (ou seja, heterorresistência). Mais especificamente, o LPA consegue detetar bactérias resistentes com mutações detetadas pelas sondas MUT se as bactérias resistentes representarem, no mínimo, 5% da população total. Contudo, é provável que não se detetem bactérias resistentes com mutações inferidas pela ausência de sondas WT se a população resistente for inferior a 95% da população bacteriana total (10, 11).

De um modo geral, as sensibilidades e as especificidades dos diversos medicamentos pesquisados pelos LPA estão descritas detalhadamente noutras fontes (12, 13). Resumidamente, o LPA-PL demonstrou uma sensibilidade e especificidade para a detecção de resistência à Rif de 96,7% e 98,8%, respetivamente, e, para a detecção de resistência à H, uma sensibilidade e especificidade de 90,2% e 99,2%, respetivamente (12). O LPA-SL (GenoType MTBDRs/ V1), testado diretamente de amostras clínicas demonstrou uma sensibilidade e especificidade agregada para a detecção de resistência às fluoroquinolonas de 86,2% e 98,6%, respetivamente, e uma sensibilidade e especificidade agregada para a detecção de resistência a medicamentos ISL de 87,0% e 99,5%, respetivamente (13).

### GenoType MTBDRplus Versão 2

O GenoType MTBDRplus (Figura 1a) pesquisa mutações específicas na região determinante de resistência à Rif (RDRR) do gene *rpoB* (do codão 505 ao 533) (Figura 2), para detetar a resistência à Rif, bem como mutações na região promotora

**Figura 1. Configuração das fitas do genótipo MTBDRplus V2 (a) e do genótipo MTBDRs/ V2 (b)**

**a (14)**

Linha	
1	..... Controlo do Conjugado
2	..... Controlo de Amplificação
3	..... Complexo <i>M. tuberculosis</i> TUB
4	..... <i>rpoB</i> Controlo do Locus <i>rpoB</i>
5	..... <i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 1 <i>rpoB</i> WT1
6	..... <i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 2 <i>rpoB</i> WT2
7	..... <i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 3 <i>rpoB</i> WT3
8	..... <i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 4 <i>rpoB</i> WT4
9	..... <i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 5 <i>rpoB</i> WT5
10	..... <i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 6 <i>rpoB</i> WT6
11	..... <i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 7 <i>rpoB</i> WT7
12	..... <i>rpoB</i> sonda tipo selvagem 8 <i>rpoB</i> WT8
13	..... <i>rpoB</i> sonda de mutação 1 <i>rpoB</i> MUT1
14	..... <i>rpoB</i> sonda de mutação 2A <i>rpoB</i> MUT2A
15	..... <i>rpoB</i> sonda de mutação 2B <i>rpoB</i> MUT2B
16	..... <i>rpoB</i> sonda de mutação 3 <i>rpoB</i> MUT3
17	..... <i>katG</i> Controlo do Locus <i>katG</i>
18	..... <i>katG</i> sonda tipo selvagem <i>katG</i> WT
19	..... <i>katG</i> sonda de mutação 1 <i>katG</i> MUT1
20	..... <i>katG</i> sonda de mutação 2 <i>katG</i> MUT2
21	..... <i>inhA</i> Controlo do Locus <i>inhA</i>
22	..... <i>inhA</i> sonda tipo selvagem 1 <i>inhA</i> WT1
23	..... <i>inhA</i> sonda tipo selvagem 2 <i>inhA</i> WT2
24	..... <i>inhA</i> sonda de mutação 1 <i>inhA</i> MUT1
25	..... <i>inhA</i> sonda de mutação 2 <i>inhA</i> MUT2
26	..... <i>inhA</i> sonda de mutação 3A <i>inhA</i> MUT3A
27	..... <i>inhA</i> sonda de mutação 3B <i>inhA</i> MUT3B
	..... Marcador colorido

**b (15)**

Linha	
1	..... Controlo do Conjugado
2	..... Controlo de Amplificação
3	..... Complexo <i>M. tuberculosis</i> TUB
4	..... <i>gyrA</i> Controlo do Locus <i>gyrA</i>
5	..... <i>gyrA</i> sonda tipo selvagem 1 <i>gyrA</i> WT1
6	..... <i>gyrA</i> sonda tipo selvagem 2 <i>gyrA</i> WT2
7	..... <i>gyrA</i> sonda tipo selvagem 3 <i>gyrA</i> WT3
8	..... <i>gyrA</i> sonda de mutação 1 <i>gyrA</i> MUT1
9	..... <i>gyrA</i> sonda de mutação 2 <i>gyrA</i> MUT2
10	..... <i>gyrA</i> sonda de mutação 3A <i>gyrA</i> MUT3A
11	..... <i>gyrA</i> sonda de mutação 3B <i>gyrA</i> MUT3B
12	..... <i>gyrA</i> sonda de mutação 3C <i>gyrA</i> MUT3C
13	..... <i>gyrA</i> sonda de mutação 3D <i>gyrA</i> MUT3D
14	..... <i>gyrB</i> Controlo do Locus <i>gyrB</i>
15	..... <i>gyrB</i> sonda tipo selvagem <i>gyrB</i> WT
16	..... <i>gyrB</i> sonda de mutação 1 <i>gyrB</i> MUT1
17	..... <i>gyrB</i> sonda de mutação 2 <i>gyrB</i> MUT2
18	..... <i>rrs</i> Controlo do Locus <i>rrs</i>
19	..... <i>rrs</i> sonda tipo selvagem 1 <i>rrs</i> WT1
20	..... <i>rrs</i> sonda tipo selvagem 2 <i>rrs</i> WT2
21	..... <i>rrs</i> sonda de mutação 1 <i>rrs</i> MUT1
22	..... <i>rrs</i> sonda de mutação 2 <i>rrs</i> MUT2
23	..... <i>eis</i> Controlo do Locus <i>eis</i>
24	..... <i>eis</i> sonda tipo selvagem 1 <i>eis</i> WT1
25	..... <i>eis</i> sonda tipo selvagem 2 <i>eis</i> WT2
26	..... <i>eis</i> sonda tipo selvagem 3 <i>eis</i> WT3
27	..... <i>eis</i> sonda de mutação 1 <i>eis</i> MUT1
	..... Marcador colorido

do *inhA* (entre os nucleótidos -16 e -8 a montante) e na região do *katG* (codão 315), para identificar a resistência à H. A **Secção dos Anexos** inclui as alterações específicas dos nucleótidos detetadas pelo teste.

## GenoType MTBDRs/ Versão 2

A segunda versão do GenoType MTBDRs/ (**Figura 1b**) inclui a região determinante de resistência às quinolonas (RDRQ) dos genes *gyrA* (do codão 85 ao 96) (**Figura 3**) e *gyrB* (do codão 536 ao 541) (**16**), para a deteção de resistência às fluoroquinolonas, e a região promotoras dos genes *rrs* (posição do ácido nucleico 1401, 1402 e 1484) e *eis* (entre os nucleótidos -37 e -2 a montante), para a deteção de resistência a medicamentos ISL. Cumpra realçar que não foram divulgadas as regiões exatas cobertas por todas as sondas MUT e que só são conhecidas algumas das regiões cobertas pelas sondas WT (cf. **Figuras 2 e 3**). A **Secção dos Anexos** inclui as alterações nucleotídicas específicas detetadas pelas sondas MUT.

## Interpretação e elaboração de laudos de ensaios de sondas em linha

O LPA tem dois controlos internos na fita: o **Controlo do Conjugado** (linha 1) e o **Controlo de Amplificação** (linha 2) (**Figura 1**). A linha do Controlo do Conjugado deve estar sempre visível para documentar a eficiência da ligação do conjugado e da reação do substrato. O Controlo de Amplificação serve de referência para a interpretação das sondas WT e MUT: só devem ser consideradas as bandas cujas intensidades sejam tão ou mais fortes do que a da banda do Controlo de Amplificação. Em caso de resultado positivo, o sinal da zona de Controlo de Amplificação pode ser fraco ou até desaparecer por completo. Tal pode ocorrer com mais frequência nos testes indiretos, sendo raro nos testes diretos. A ausência de Controlo de Amplificação pode dever-se à competição das diversas reações durante a amplificação. Nesse caso, o teste foi realizado corretamente e pode ser interpretado. Caso o teste dê um resultado negativo, as duas bandas de Controlo do Conjugado e Controlo de Amplificação devem estar sempre visíveis (ou seja, resultado negativo válido). A ausência de Controlo de Amplificação num teste negativo é reveladora de erros durante a preparação e/ou a realização da reação de amplificação ou da presença de inibidores de amplificação. Nesse caso, o resultado do teste é **inválido** e o teste deve ser repetido.

A **banda de reação TUB** (linha 3) só estará presente se o ADN amplificado for de membros do MTBC. A presença de micobactérias não tuberculosas (NTM) na amostra poderá gerar padrões aleatórios de bandas, com resultados positivos nalgumas bandas WT do gene *rpoB* pelo facto de algumas espécies de NTM apresentarem semelhanças genéticas neste gene. Portanto, se houver somente a presença de NTM na amostra, a banda TUB estará sempre ausente e o resultado do teste será MTBC não detetado.

As bandas de **controlo do locus** genético para as diversas regiões-alvo analisadas na fita de ADN estão localizadas antes das respetivas bandas WT e MUT. Estas bandas de controlo do locus devem estar sempre presentes para que o ensaio seja considerado válido para o alvo correspondente. Contudo, se só faltar uma banda de controlo de um locus genético, podem ser interpretados os resultados para os demais genes para os quais esteja presente a banda de controlo do locus genético respetivo.

O LPA deve ser considerado **indeterminado** para um medicamento ou conjunto de medicamentos específico se faltar o controlo do locus para esse medicamento

ou conjunto de medicamentos específico e o teste for válido (ou seja, as bandas do Controlo do Conjugado e TUB estão visíveis com ou sem o Controlo de Amplificação). Nesse caso, o ensaio deve ser repetido antes da comunicação dos resultados.

Caso se obtenha o mesmo resultado após novo teste, os resultados dos loci interpretáveis devem ser comunicados de acordo com o guia, enquanto o resultado relativo aos medicamentos ou conjunto de medicamentos para os quais falta o controlo do locus deve ser dado como indeterminado. Entre os motivos sistemáticos para estes resultados indeterminados podem estar mutações ou deleções na região de controlo do locus, bem como a deleção total ou parcial de um gene-alvo. Nestes casos, deve-se realizar a sequenciação a fim de se identificar a mutação específica.

As **zonas de reação WT** incluem regiões do genoma com mutações de resistência conhecidas. As **zonas de reação MUT** correspondem a sondas que identificam as mutações de resistência mais comuns do gene pesquisado.

A resistência é detetada quando as sondas MUT são hibridadas, ao passo que, na ausência de sondas WT, só é possível inferir a resistência (cf. pormenores infra).

A deteção concomitante de todas as sondas WT e de uma das sondas MUT na região-alvo correspondente indica a presença de heterorresistência (ou seja, coexistência de bactérias sensíveis e resistentes na mesma amostra). Neste caso, o resultado comunicado deve ser de resistência.

## Revisão das interpretações do fabricante (14, 15)

### *Utilização do termo «Resistência não detetada» em vez de «Sensível» para definir o perfil de resistência das bactérias*

Diante das limitações do LPA e, em particular, do facto de não ser possível excluir completamente a resistência mesmo na presença de todas as sondas WT (ou seja, nem todas as mutações que conferem resistência são cobertas por estes testes ou as mutações que são cobertas podem estar abaixo do limite de deteção), é mais adequado comunicar o resultado como «Resistência detetada» ou «Resistência não detetada».

### *Diferenciação entre «Resistência inferida» e «Resistência detetada»*

O termo «Resistência inferida» é usado sempre que não houver hibridação com uma ou mais sondas WT em regiões do gene conhecidas por conferir resistência ao medicamento e não houver nenhuma sonda MUT detetada na região correspondente. Neste caso, não é possível comunicar a mutação exata, sendo somente identificada a região em que fica a mutação.

O termo «Resistência detetada» é usado sempre que houver hibridação com uma ou mais sondas MUT que identificam as mutações específicas que conferem resistência aos medicamentos (independentemente das sondas WT serem, ou não, detetadas).

### *Estratificação de mutações de resistência para a Isoniazida (H) e a Moxifloxacina (Mfx) em mutações associadas a um «aumento da CIM de baixo nível» e a um «aumento da CIM de alto nível»*

As mutações que conferem resistência à H e à Mfx são estratificadas em mutações associadas a um aumento da CIM de baixo nível e a um aumento da CIM de alto nível, em função da distribuição da CIM que lhes esteja associada. Esta estratificação tem

---

implicações importantes para a inclusão da H e da Mfx no regime de tratamento, dado que, com o aumento da dose do medicamento, o agente antimicrobiano pode ser eficaz contra a resistência resultante das mutações associadas a aumentos das CIM de baixo nível para a H ou a Mfx.

Para a H, os resultados *in vitro* sugerem que, quando são detetadas mutações específicas na região promotora do *inhA*, geralmente associadas ao aumento da CIM de baixo nível (e na ausência de mutações do *katG*), poderá ser eficaz aumentar a dose do medicamento. Assim, pode-se considerar usar a H na dose máxima de 15 mg/kg por dia. Em caso de mutações do *katG*, geralmente associadas ao aumento da CIM de alto nível, é menos provável que a utilização da H seja eficaz, mesmo com o aumento da dose. A presença de mutações combinadas na região promotora do *inhA* e no gene *katG* resulta em aumentos substanciais da CIM, que dificilmente serão compensados pelo aumento da dose (17).

Para a Mfx, se as mutações estiverem associadas a aumentos da CIM acima da CC, mas abaixo do ponto de corte clínico (PPC), definidas como mutações associadas ao aumento da CIM de baixo nível, é provável que seja eficaz uma dose elevada de Mfx (até 800 mg por dia em adultos) (18–21). Quando é inferida resistência à Mfx (ou seja, a mutação específica é desconhecida), é inferida a presença de mutações associadas pelo menos ao aumento da CIM de baixo nível. Logo, uma dose elevada do medicamento poderá ainda ser eficaz. Contudo, neste caso, recomenda-se a realização de um TSA à Mfx no PCC e, se disponível, uma sequenciação para determinar a mutação específica. Se a estirpe do MTBC for resistente à Mfx na concentração do PCC devido à presença de mutações associadas ao aumento da CIM de alto nível, o medicamento não pode ser considerado eficaz.

Sempre que houver mais do que uma sonda por medicamento que forneça informações (p. ex., detecção concomitante de mutações de resistência associadas a aumentos diferentes da CIM), o critério aplicado na interpretação é que as mutações associadas ao aumento da CIM de alto nível prevalecem sobre as mutações associadas ao aumento da CIM de baixo nível.

Em resumo, os resultados devem ser comunicados de acordo com a seguinte hierarquia (o sinal ">" significa «invalida»):

- *Para a H:* Mutação detetada associada ao aumento da CIM de alto nível > Mutação inferida associada ao aumento da CIM de alto nível > Mutação detetada associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível > Mutação inferida associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível > Resistência não detetada.
- *Para a Mfx:* Mutação detetada associada ao aumento da CIM de alto nível > Mutação detetada associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível > Mutação inferida associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível > Resistência não detetada.
- *Para a Rif, a levofloxacina (Lfx), a amicacina (Am), a canamicina (Km) e a capreomicina (Cm):* Resistência detetada > Resistência inferida > Resistência não detetada.

## Resumo

Caso	Zonas de reação WT	Zonas de reação MUT	Interpretação
1	Todas as sondas WT estão presentes	Nenhuma sonda MUT presente	Resistência não detetada.
2	Uma ou mais sondas WT não estão presentes	Uma ou mais sondas MUT na região correspondente estão presentes	Em função do medicamento específico: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Resistência detetada (Rif, medicamentos ISL);</li> <li>– Mutações detetadas associadas ao aumento da CIM de alto nível (H e Mfx);</li> <li>– Mutações detetadas associadas, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível (H e Mfx);</li> </ul>
3	Uma ou mais sondas WT não estão presentes	Nenhuma sonda MUT presente	Em função do medicamento específico: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Resistência inferida (Rif, medicamentos ISL);</li> <li>– Mutações inferidas associadas ao aumento da CIM de alto nível (H e Mfx);</li> <li>– Mutações inferidas associadas, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível (H e Mfx);</li> </ul>
4	Todas as sondas WT estão presentes	Uma sonda MUT presente	Detetada resistência (devido a heterorresistência); interpretar de acordo com o caso 2.

**Exclusão da sonda eis WT3**

Até à data, não há evidências claras de que a mutação **c-2a** na região promotora do *eis* represente, por si, um marcador de resistência válido (1). Portanto, se a sonda *eis* WT3 não estiver presente, a interpretação revisada do teste para a Km é «Resistência não detetada».

**Interpretação do perfil de resistência à etionamida e à protionamida**

As mutações que provoquem uma superexpressão do gene *inhA*, como as detetadas pelo LPA-PL, estão associadas a resistência cruzada à etionamida (Eto) e à protionamida (Pto) (1, 22, 23). Desta forma, se o teste detetar essas mutações, deve-se informar a resistência à Eto e à Pto, não devendo estes medicamentos ser utilizados no regime de tratamento. Contudo, cumpre realçar que, mesmo em caso de ausência de mutações na região promotora do *inhA*, não é possível excluir a resistência à Eto/Pto. Na verdade, pode haver mutações que conferem resistência à Eto/Pto em regiões genómicas não pesquisadas pelo LPA (p. ex., *ethA*, *ethR*).

**Comunicação de resultados relativos à canamicina e a capreomicina**

Recentemente, a OMS divulgou uma breve comunicação sobre alterações chave no tratamento da TB-MDR e Rif resistente (24), antecipando aspetos fundamentais das novas diretrizes da OMS relativas ao tratamento da TB-MDR, que serão divulgadas no final de 2018. Essas alterações baseiam-se nos resultados de uma meta-análise destinada a avaliar a associação entre o sucesso do tratamento e o óbito pela utilização de medicamentos específicos, bem como o número e a duração ideais dos tratamentos com esses medicamentos em pacientes com TB-MDR (25).

Quanto à utilização de medicamentos ISL, os resultados da meta-análise mostram que, em comparação com regimes sem medicamentos injetáveis, a Am apresentou benefícios limitados, ao passo que a Km e a Cm não revelaram quaisquer benefícios ou revelaram resultados piores. Por conseguinte, a OMS já não recomenda a utilização da Km e da Cm devido ao maior risco de fracasso do tratamento e de recidiva associados à sua utilização em tratamentos mais prolongados da TB-MDR. Além disso, os programas que utilizam o regime padronizado mais curto de TB-MDR devem substituir a Km pela Am sem aguardar o consumo total do estoque existente de Km (24).

Reconhecendo que não seria possível concretizar com efeito imediato as novas normas da OMS em todos os pacientes com TB-MDR, e que, provavelmente, a Km e a Cm serão usadas durante a fase de transição, este documento inclui a interpretação de LPA-SL para a Km e a Cm com o objetivo de proporcionar orientação provisória.

### Ações de diagnóstico adicionais de seguimento para conduzir um tratamento adequado da TB

Em função da região específica pesquisada pelos LPA-PL e LPA-SL, são recomendadas ou sugeridas como opcionais uma ou mais ações de diagnóstico de seguimento com o objetivo de melhor orientar a escolha do regime de tratamento. A decisão de realizar as ações de diagnóstico opcionais de seguimento deve levar em linha de conta o risco individual de resistência do paciente e a prevalência de resistência na localização geográfica específica, dado que estes fatores afetam o valor preditivo positivo do teste.

Em função do medicamento, são recomendadas ou sugeridas como opcionais diferentes ações de diagnóstico de seguimento. Essas ações são resumidas de seguida:

#### Rifampicina (Rif):

- Se a resistência for inferida pela ausência de ligação dos amplicons com as sondas WT (ou seja, uma ou mais sondas WT ausentes), sugere-se opcionalmente a sequenciação do gene *rpoB* para identificar a mutação específica. Para a interpretação das mutações do *rpoB*, consultar o guia técnico da OMS sobre a utilização da tecnologia de sequenciação da próxima geração (3). Cumpre realçar que o TSA fenotípico realizado por MGIT não deve ser visto como o teste de confirmação ideal, dado que não deteta mutações bem estabelecidas que estão associadas à resistência à Rif (ou seja, mutações «disputadas» que conferem baixa resistência à rif) (26–29).

#### Isoniazida (H):

- Se a resistência for inferida pela ausência de ligação dos amplicons com as sondas WT na região do *katG* (ou seja, uma ou mais sondas WT estiverem ausentes), sugere-se opcionalmente a sequenciação do gene *katG* para identificar a mutação específica. Para a interpretação das mutações do *katG*, consultar o guia técnico da OMS sobre a utilização da tecnologia de sequenciação da próxima geração (3).
- Se forem detetadas mutações associadas ao aumento da CIM de baixo nível (ou seja, sondas MUT presentes na região promotora do *inhA* na ausência de mutações na região-alvo do *katG*), sugere-se opcionalmente a sequenciação da região de codificação do *inhA*.

- Tal deve-se ao facto de que a presença concomitante de mutações adicionais na região de codificação do *inhA*, ou em posições diferentes da 315 no gene *katG* (mutações não detetadas pelo GenoType MTBDR<sub>plus</sub>) (30, 31), geralmente raras, mas que podem ser mais frequentes em localizações geográficas específicas, pode provocar aumentos significativos da CIM, demasiado elevados para serem compensados com o aumento da dose do medicamento.
- Se forem inferidas mutações associadas ao aumento da CIM de baixo nível pela ausência de ligação dos amplicons com as sondas WT na região promotora do *inhA* (e não forem detetadas mutações na região-alvo do *katG*), recomenda-se a repetição do teste para confirmar o resultado. Algumas ações de diagnóstico opcionais de seguimento consistem na sequenciação do promotor do *inhA* para identificar a mutação específica ou um TSA fenotípico à H.

#### Moxifloxacina (Mfx):

- Se forem detetadas mutações associadas ao aumento da CIM de baixo nível (ou seja, sondas MUT1, MUT2 e MUT3A presentes no *gyrA* e/ou sondas MUT1 e MUT2 presentes nas regiões do *gyrB*), recomenda-se um TSA fenotípico à Mfx para excluir resistência no PCC.
- Se forem inferidas mutações associadas ao aumento da CIM de baixo nível pela ausência de ligação dos amplicons com as sondas WT nas regiões do *gyrA* ou do *gyrB* (ou seja, sondas WT ausentes), recomenda-se um TSA fenotípico à Mfx, a fim de excluir resistência no PCC. Algumas ações opcionais de seguimento consistem na sequenciação da RDRQ do *gyrA* e/ou do *gyrB* para identificar a mutação específica e/ou num TSA fenotípico à Mfx (e/ou à Lfx) na CC (em função da capacidade do laboratório).

#### Amicacina (Am), canamicina (Km)<sup>1</sup> e capreomicina (Cm)<sup>1</sup>:

- Se for inferida resistência pela ausência de ligação dos amplicons com as sondas WT na região *rrs* (ou seja, uma ou mais sondas WT ausentes), recomenda-se a repetição do teste para confirmar o resultado. Se o resultado for confirmado, deve fazer-se um TSA fenotípico à Am, à Km e à Cm para confirmar a resistência. Opcionalmente, sugere-se a sequenciação do gene *rrs* para identificar a mutação específica.

---

<sup>1</sup> Já não se recomenda a utilização de Km e de Cm no tratamento da TB resistente à Rif/MDR (24). Os laboratórios devem continuar a informar os resultados relativos à Cm e à Km até à plena implementação das recomendações.

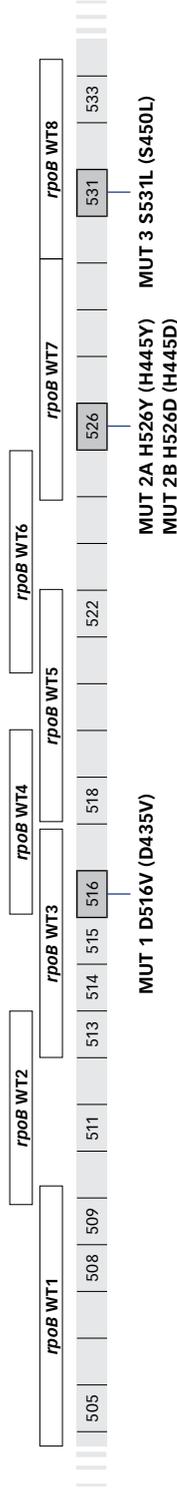
---

# Interpretação do ensaio de sondas em linha (LPA) de primeira linha (PL)

## Rifampicina

**Figura 2. Região determinante de resistência à rifampicina pesquisada pelo Genotype MTBDRplus**

Região determinante de resistência à rifampicina (RDRR) do gene *rpoB*, os códons cobertos pelas sondas WT e as mutações específicas reconhecidas pelas sondas MUT no Genotype MTBDRplus Versão 2.0 – para a numeração dos códons E. coli vs. MTB e nomenclatura de aminoácidos (74). Em geral, a especificidade do Genotype MTBDRplus Versão 2.0 para a resistência à Rif é muito boa. Porém, em caso de dúvida quanto à validade de um resultado relativo à resistência à Rif, como regra de ouro deve pedir-se a sequenciação do *rpoB*.



Região-alvo	Sonda MTBDRplus	Mutação(ões) ou região pesquisada	Interpretação dos resultados	Ação de diagnóstico adicional <sup>a</sup>	Implicações clínicas
<i>rpoB</i> WT1	<i>rpoB</i> WT1 <b>ausente</b>	Mutação(ões) nos códons 505-509 (424-428) <sup>b</sup>	Resistência à rifampicina (Rif) inferida	<b>Opcional:</b> fazer sequenciação do <i>rpoB</i> para identificar a mutação específica.	A rifampicina não é eficaz
<i>rpoB</i> WT2	<i>rpoB</i> WT2 <b>ausente</b>	Mutação(ões) nos códons 510-513 (429-432) <sup>b</sup>	Resistência à Rif inferida	<b>Opcional:</b> fazer sequenciação do <i>rpoB</i> para identificar a mutação específica.	A rifampicina não é eficaz
<i>rpoB</i> WT2/3	<i>rpoB</i> WT2 WT3 <b>ausente</b>	Mutação(ões) nos códons 510-517 (429-436) <sup>b</sup>	Resistência à Rif inferida	<b>Opcional:</b> fazer sequenciação do <i>rpoB</i> para identificar a mutação específica.	A rifampicina não é eficaz

Região-alvo	Sonda MTBDRplus	Mutação ou região pesquisada	Interpretação dos resultados	Ação de diagnóstico adicional <sup>a</sup>	Implicações clínicas
<i>rpoB</i> WT3/4	<i>rpoB</i> MUT1 presente	D516V (D435V) <sup>b</sup>	Resistência à Rif detetada	Não são necessárias ações de diagnóstico adicionais.	A rifampicina não é eficaz
	<i>rpoB</i> WT3, WT4 e MUT1 <b>ausentes</b>	Mutação(ões) nos códões 513–519 (432–438) <sup>b</sup>	Resistência à Rif inferida	<b>Opcional:</b> fazer sequencição do <i>rpoB</i> para identificar a mutação específica.	A rifampicina não é eficaz
<i>rpoB</i> WT4/5	<i>rpoB</i> WT4 e WT5 <b>ausentes</b>	Mutação(ões) nos códões 516–522 (435–441) <sup>b</sup>	Resistência à Rif inferida	<b>Opcional:</b> fazer sequencição do <i>rpoB</i> para identificar a mutação específica.	A rifampicina não é eficaz
	<i>rpoB</i> WT5/6	Mutação(ões) nos códões 518–525 (437–444) <sup>b</sup>	Resistência à Rif inferida	<b>Opcional:</b> fazer sequencição do <i>rpoB</i> para identificar a mutação específica.	A rifampicina não é eficaz
<i>rpoB</i> WT7	<i>rpoB</i> MUT2A presente	H526Y (H445Y) <sup>b</sup>	Resistência à Rif detetada	Não são necessárias ações de diagnóstico adicionais	A rifampicina não é eficaz
	<i>rpoB</i> MUT2B presente	H526D (H445D) <sup>b</sup>	Resistência à Rif detetada	Não são necessárias ações de diagnóstico adicionais	A rifampicina não é eficaz
<i>rpoB</i> WT8	<i>rpoB</i> WT7, MUT2A e MUT2B <b>ausentes</b>	Mutação(ões) nos códões 526–529 (445–448) <sup>b</sup>	Resistência à Rif inferida	<b>Opcional:</b> fazer sequencição do <i>rpoB</i> para identificar a mutação específica.	A rifampicina não é eficaz
	<i>rpoB</i> MUT3 presente	S531L (S450L) <sup>b</sup>	Resistência à Rif detetada	Não são necessárias ações de diagnóstico adicionais	A rifampicina não é eficaz
	<i>rpoB</i> WT8 e MUT3 <b>ausentes</b>	Mutação(ões) nos códões 530–533 (449–452) <sup>b</sup>	Resistência à Rif inferida	<b>Opcional:</b> fazer sequencição do <i>rpoB</i> para identificar a mutação específica.	A rifampicina não é eficaz

<sup>a</sup> A decisão de realizar ações de diagnóstico opcionais deve levar em linha de conta o grupo de risco de resistência a que o paciente pertence e a prevalência de resistência na localização geográfica específica, dado que estes fatores afetam o valor preditivo positivo do teste. As mutações silenciosas podem ser mais preocupantes em locais com baixa prevalência da resistência à rifampicina.

<sup>b</sup> A numeração do codão MTB de acordo com Andre et al (32) encontra-se entre parêntesis.

Isoniazida

Região-alvo	Sonda MTBDRp/ius	Mutação ou região pesquisada	Interpretação dos resultados	Ação de diagnóstico adicional <sup>a</sup>	Implicações clínicas
katG WT	katG MUT1 ou MUT2 presente	S315T1 /S315T2	Mutação detetada associada ao aumento da CIM de alto nível.	Não são necessárias ações de diagnóstico adicionais	É improvável que a isoniazida seja eficaz, mesmo com doses elevadas (17).
	katG WT, MUT1 e MUT2 ausentes <sup>b</sup>	Mutação(ões) no codão 315	Mutação inferida associada ao aumento da CIM de alto nível.	<b>Opcional:</b> fazer sequenciação do <i>katG</i> para identificar mutação específica.	É improvável que a isoniazida seja eficaz, mesmo com doses elevadas (17).
inhA WT1	inhA MUT1 presente	c-15t	Mutação detetada associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível. Resistência à Eto/Pto detetada.	<b>Opcional:</b> fazer sequenciação da região de codificação do <i>inhA</i> e do gene <i>katG</i> . Sem ações de diagnóstico adicionais para Eto/Pto.	É provável que a isoniazida seja eficaz numa dose elevada (17). A etionamida/protionamida não são eficazes.
	inhA MUT2 presente	a-16g <sup>d</sup>	Mutação detetada provavelmente associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível. Resistência à Eto/Pto provavelmente detetada.	<b>Opcional:</b> fazer sequenciação da região de codificação do <i>inhA</i> e do gene <i>katG</i> . Sem ações de diagnóstico adicionais para Eto/Pto.	É provável que a isoniazida seja eficaz numa dose elevada (23). É provável que a etionamida/protionamida não sejam eficazes.
	inhA WT1, MUT1 e MUT2 ausentes	Mutação(ões) na região -15 <sup>d</sup>	Mutação inferida provavelmente associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível. Resistência à Eto/Pto provavelmente inferida.	Recomendado: repetir LPA-PL para confirmar o resultado. <b>Opcional:</b> - fazer sequenciação para identificar mutação específica. - fazer TSA fenotípico à H e à Eto/Pto.	É provável que a isoniazida seja eficaz numa dose elevada (23). É provável que a etionamida/protionamida não sejam eficazes.

Região-alvo	Sonda MTBD <i>Rplus</i>	Mutação ou região pesquisada	Interpretação dos resultados	Ação de diagnóstico adicional <sup>a</sup>	Implicações clínicas
<i>inhA</i> WT	<i>InhA</i> MUT3A presente	t-8c <sup>d</sup>	Mutação detetada provavelmente associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível. Resistência à Eto/Pto provavelmente detetada.	<b>Opcional:</b> fazer sequencição da região de codificação do <i>inhA</i> e do gene <i>katG</i> . Sem ações de diagnóstico adicionais para Eto/Pto.	É provável que a isoniázida seja eficaz numa dose elevada (23). É provável que a etionamida/ protionamida não sejam eficazes.
	<i>InhA</i> MUT3B presente	t-8a <sup>d</sup>	Mutação detetada provavelmente associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível. Resistência à Eto/Pto provavelmente detetada.	<b>Opcional:</b> fazer sequencição da região de codificação do <i>inhA</i> e do gene <i>katG</i> . Sem ações de diagnóstico adicionais para Eto/Pto.	É provável que a isoniázida seja eficaz numa dose elevada (23). É provável que a etionamida/ protionamida não sejam eficazes.
	<i>InhA</i> WT2, MUT3A e MUT3B ausentes	Mutação na região -8 <sup>d</sup>	Mutação inferida provavelmente associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível. Resistência à Eto/Pto provavelmente inferida.	<b>Recomendado:</b> repetir LPA-PL para confirmar o resultado. <b>Opcional:</b> – fazer sequencição para identificar mutação específica. – fazer TSA fenotípico à H, à Eto/Pto.	É provável que a isoniázida seja eficaz numa dose elevada (23). É provável que a etionamida/ protionamida não sejam eficazes.

<sup>a</sup> A decisão de realizar ações de diagnóstico opcionais de seguimento deve levar em linha de conta o grupo de risco de resistência a que o paciente pertence e a prevalência de resistência na localização geográfica específica, dado que estes fatores afetam o valor preditivo positivo do teste.

<sup>b</sup> A deleção parcial ou total do gene *katG*, que está associada ao aumento da CIM de alto nível, resulta na ausência total de bandas de locus do *katG* (ou seja, as sondas de controlo do locus do *katG*, WT e MUT não estão presentes).

<sup>c</sup> A presença concomitante de mutações adicionais na região de codificação do *inhA* ou em posições diferentes da 315 no gene *katG* (mutações não detetadas pelo Genotype MTBDR*plus*) (30, 31) geralmente raras, mas que podem ser mais frequentes em localizações geográficas específicas, pode provocar aumentos significativos da CIM, demasiado elevados para serem compensados com o aumento da dose do medicamento.

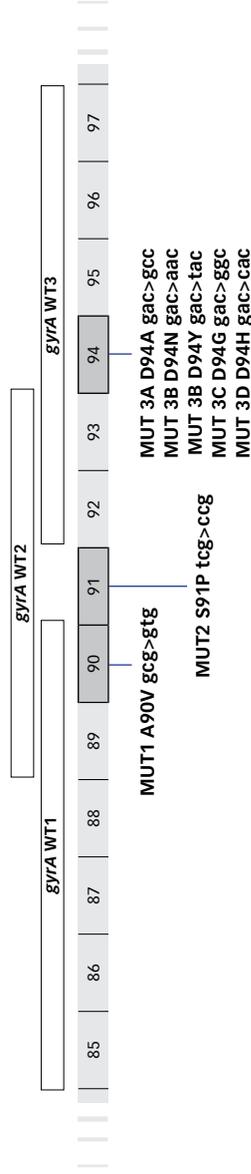
<sup>d</sup> São necessários mais dados que correlacionem estas mutações com o TSA fenotípico à isoniázida a fim de aumentar a confiança na associação dessas mutações à resistência ao medicamento.

# Interpretação do ensaio de sondas em linha (LPA) de segunda linha (SL)

## Fluoroquinolonas

**Figura 3. Região determinante de resistência a quinolonas do gene *gyrA* pesquisada pelo Genotype MTBDRsI.**

Região determinante de resistência a quinolonas (RDRQ) do gene *gyrA*, os códons cobertos pelas sondas WT e as mutações específicas (alterações aminoácidas e nucleotídicas) reconhecidas pelas sondas MUT no Genotype MTBDRsI Versão 2.0 (15).



Região-alvo	Sonda MTBDRs/	Mutação ou região pesquisada	Interpretação dos resultados	Ação de diagnóstico adicional <sup>a</sup>	Implicações clínicas
<i>gyrA</i> WT 1	<i>gyrA</i> WT1 ausente	Codão(ões) 85–89	Resistência à Lfx inferida. Mutação inferida associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	<b>Recomendado:</b> fazer TSA fenotípico à Mfx no PCC para excluir resistência. <b>Opcional:</b> – fazer sequenciação da RDRQ do <i>gyrA</i> para identificar mutação específica; – fazer TSA fenotípico à Lfx e à Mfx na CC.	A levofloxacina não é eficaz. Pode-se usar moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC. <b>Nota:</b> estas recomendações não se aplicam se a sequenciação, disponível antes do início do tratamento, identificar mutações não associadas a FQ, ou se o TSA fenotípico revelar sensibilidade na CC.

Região-alvo	Sonda MTBDRs/	Mutação ou região pesquisada	Interpretação dos resultados	Ação de diagnóstico adicional <sup>a</sup>	Implicações clínicas
gyrA WT2	gyrA MUT1 presente	A90V	Resistência à Lfx detetada. Mutação detetada associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	<b>Recomendado:</b> fazer TSA fenotípico à Mfx no PCC para excluir resistência.	A levofloxacina não é eficaz. Pode usar-se moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC.
	gyrA MUT2 presente	S91P	Resistência à Lfx detetada. Mutação detetada associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	<b>Recomendado:</b> fazer TSA fenotípico à Mfx no PCC para excluir resistência.	A levofloxacina não é eficaz. Pode usar-se moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados do TSA fenotípico no PCC.
gyrA WT3	gyrA WT2, MUT1 e MUT2 ausentes	Codão(ões) 89-93	Resistência à Lfx inferida. Mutação inferida associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	<b>Recomendado:</b> fazer TSA fenotípico à Mfx no PCC para excluir resistência. <b>Opcional:</b> – fazer sequenciação da RDQ do <i>gyrA</i> para identificar mutação específica; – fazer TSA fenotípico à Lfx e à Mfx na CC.	A levofloxacina não é eficaz. Pode-se usar moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC. <b>Nota:</b> estas recomendações não se aplicam se a sequenciação, disponível antes do início do tratamento, identificar mutações não associadas a FQ, ou se o TSA fenotípico revelar sensibilidade na CC.
	gyrA MUT3A presente	D94A	Resistência à Lfx detetada. Mutação detetada associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	<b>Recomendado:</b> fazer TSA fenotípico à Mfx no PCC para excluir resistência.	A levofloxacina não é eficaz. Pode usar-se moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC.
gyrA WT3	gyrA MUT3B presente	D94N ou D94Y	Resistência à Lfx detetada. Mutação detetada associada ao aumento da CIM de alto nível para a Mfx.	Não são necessárias ações de diagnóstico adicionais.	A levofloxacina não é eficaz. A moxifloxacina não é eficaz.

Região-alvo	Sonda MTBDRs/	Mutação ou região pesquisada	Interpretação dos resultados	Ação de diagnóstico adicional <sup>a</sup>	Implicações clínicas
g <sub>yrA</sub> WT3	g <sub>yrA</sub> MUT3C presente	D94G	Resistência à Lfx detetada. Mutação detetada associada ao aumento da CIM de alto nível para a Mfx.	Não são necessárias ações de diagnóstico adicionais.	A levofloxacina não é eficaz. A moxifloxacina não é eficaz.
	g <sub>yrA</sub> MUT3D presente	D94H	Resistência à Lfx detetada. Mutação detetada associada ao aumento da CIM de alto nível para a Mfx.	Não são necessárias ações de diagnóstico adicionais.	A levofloxacina não é eficaz. A moxifloxacina não é eficaz.
	g <sub>yrA</sub> WT3, MUT3A, MUT3B, MUT3C e MUT3D <b>ausentes</b>	Codão(ões) 92–96	Resistência à Lfx inferida. Mutação inferida associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	<b>Recomendado:</b> fazer TSA fenotípico à Mfx no PCC para excluir resistência. <b>Opcional:</b> – fazer sequenciação da RDRQ do g <sub>yrA</sub> para identificar mutação específica; – fazer TSA fenotípico à Lfx e à Mfx na CC.	A levofloxacina não é eficaz. Pode usar-se moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC. <b>Nota:</b> estas recomendações não se aplicam se a sequenciação, disponível antes do início do tratamento, identificar mutações não associadas a FQ, ou se o TSA fenotípico revelar sensibilidade na CC.

<sup>a</sup> A decisão de realizar ações de diagnóstico opcionais de seguimento deve levar em conta o grupo de risco de resistência a que o paciente pertence e pela prevalência de resistência na localização geográfica específica, dado que estes fatores afetam o valor preditivo positivo do teste.

Região-alvo	Sonda MTBDRs/ <i>gyrB</i> MUT1 presente	Mutação ou região pesquisada N538D (codão 499) <sup>b</sup>	Interpretação dos resultados Resistência à Lfx detetada. Mutação detetada associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	Ação de diagnóstico adicional <sup>a</sup> <b>Recomendado:</b> fazer TSA fenotípico à Mfx para excluir resistência no PCC.	Implicações clínicas A levofloxacina não é eficaz. Pode usar-se moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC.
<i>gyrB</i> WT	<i>gyrB</i> MUT2 presente	E540V (codão 501) <sup>b</sup>	Resistência à Lfx detetada. Mutação detetada associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	<b>Recomendado:</b> fazer TSA fenotípico à Mfx para excluir resistência no PCC.	A levofloxacina não é eficaz. Pode usar-se moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC.
	<i>gyrB</i> WT, MUT1 e MUT2 <b>ausentes</b>	Codão (ões) 536–541 (codão 497–502) <sup>b</sup>	Resistência à Lfx inferida. Mutação inferida associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	<b>Recomendado:</b> fazer TSA fenotípico à Mfx para excluir resistência no PCC. <b>Opcional:</b> – fazer sequenciação da RDRQ do <i>gyrA</i> para identificar mutação específica; – fazer TSA fenotípico à Lfx e à Mfx na CC.	A levofloxacina não é eficaz. Pode usar-se moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC. <b>Nota:</b> estas recomendações não se aplicam se a sequenciação, disponível antes do início do tratamento, identificar mutações não associadas a FQ, ou se o TSA fenotípico demonstrar sensibilidade na CC.

a A decisão de realizar ações de diagnóstico opcionais de seguimento deve levar em linha de conta o grupo de risco de resistência a que o paciente pertence e pela prevalência de resistência na localização geográfica específica, dado que estes fatores afetam o valor preditivo positivo do teste.

b Sistema de numeração de códons de acordo com Camus et al (33).

Injetáveis de segunda linha<sup>a</sup>

Região-alvo	Sonda MTBDRs/	Mutação ou região pesquisada	Interpretação de resultados p/ canamicina (Km)	Interpretação de resultados p/ amicacina (Am)	Interpretação de resultados p/ capreomicina (Cm)	Ação de diagnóstico adicional <sup>b</sup>	Implicações clínicas
rrs WT1	rrs MUT1 presente	a1401g	Resistência à Km detetada.	Resistência à Am detetada.	Resistência à Cm detetada.	Não são necessárias ações de diagnóstico adicionais.	A amicacina, a canamicina e a capreomicina não são eficazes.
	rrs WT1 e MUT1 <b>ausentes</b>	Mutação(ões) na região 1400	Resistência à Km inferida.	Resistência à Am inferida <sup>c</sup>	Resistência à Cm inferida.	<b>Recomendado:</b> repetir o teste LPA-SL e, se o resultado for confirmado, fazer TSA fenotípico à Am, à Km e à Cm. <b>Opcional:</b> fazer sequenciação para identificar mutação específica.	É provável que a canamicina e a capreomicina não sejam eficazes. O resultado do TSA fenotípico deve orientar a escolha da amicacina no regime de tratamento.
rrs WT2	rrs MUT2 presente	g1484t	Resistência à Km detetada.	Resistência à Am detetada.	Resistência à Cm detetada.	Não são necessárias ações de diagnóstico adicionais.	A amicacina, a canamicina e a capreomicina não são eficazes.
	rrs WT2 e MUT2 <b>ausentes</b>	Mutação na região 1484	Resistência à Km inferida.	Resistência à Am inferida.	Resistência à Cm inferida.	<b>Recomendado:</b> repetir o teste LPA-SL e, se o resultado for confirmado, fazer TSA fenotípico à Am, à Km e à Cm. <b>Opcional:</b> fazer sequenciação para identificar mutação específica.	É provável que a amicacina, a canamicina e a capreomicina não sejam eficazes.

Região-alvo	Sonda MTBDRs/	Mutação ou região pesquisada	Interpretação de resultados p/ canamicina (Km)	Interpretação de resultados p/ amicacina (Am)	Interpretação de resultados p/ capreomicina (Cm)	Ação de diagnóstico adicional <sup>b</sup>	Implicações clínicas
eis WT1	eis WT1 <b>ausente</b>	Mutação(ões) na região -37	Resistência à Km inferida.	Resistência à Am não detetada.	Resistência à Cm não detetada.	<b>Opcional:</b> fazer sequencição para identificar mutação específica.	A amicacina é provavelmente eficaz. A capreomicina é provavelmente eficaz. A canamicina não é eficaz.
eis WT2	eis MUT1 presente	c-14t	Resistência à Km detetada.	Resistência à Am não detetada.	Resistência à Cm não detetada.	<b>Opcional:</b> fazer sequencição para identificar mutação específica.	A amicacina é provavelmente eficaz. A capreomicina é provavelmente eficaz. A canamicina não é eficaz.
eis WT3	eis WT2 e MUT1 <b>ausentes</b>	Mutação(ões) na região -10 a -15	Resistência à Km inferida.	Resistência à Am não detetada.	Resistência à Cm não detetada.	<b>Opcional:</b> fazer sequencição para identificar mutação específica.	A amicacina é provavelmente eficaz. A capreomicina é provavelmente eficaz. É provável que a canamicina não seja eficaz.
eis WT3	eis WT3 <b>ausente</b>	Mutação(ões) na região -2 <b>Nota:</b> não há evidências de que as mutações nesta região estejam associadas a resistência (7)	Resistência à Km não detetada.	Resistência à Am não detetada.	Resistência à Cm não detetada.	<b>Opcional:</b> fazer sequencição para identificar mutação específica.	A amicacina é provavelmente eficaz. A capreomicina é provavelmente eficaz. A canamicina é provavelmente eficaz.

- a A OMS já não recomenda a utilização da canamicina e da capreomicina devido ao maior risco de fracasso do tratamento e de recidiva associados à sua utilização em regimes de tratamento mais prolongados da TB-MDR (23). Este documento inclui a interpretação de LPA-SL para a canamicina e capreomicina com o objetivo de proporcionar orientação provisória durante a fase de transição.
- b A decisão de realizar ações de diagnóstico adicionais indicadas como opcionais deve levar em linha de conta o grupo de resistência a que o paciente pertence e a prevalência de resistência na localização geográfica específica, dado que estes fatores afetam o valor preditivo positivo do teste.
- c É impossível identificar a mutação exata porque não há sondas MUT hibridadas na região rrs 1400. Dado que este perfil de bandamento pode ser provocado por uma mutação provavelmente não associada à resistência à Am (p. ex., c1402t), infere-se resistência ao medicamento até se efetuar um TSA fenotípico, usando-se esse resultado para reavaliar o regime de tratamento.

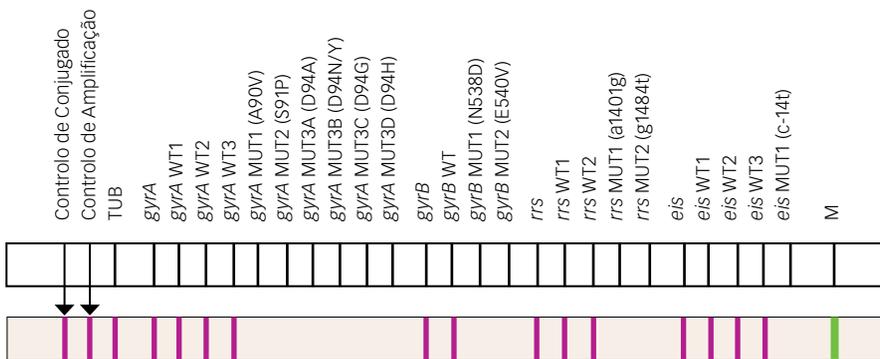
---

# Guia de avaliação de casos de TB resistente a medicamentos com base em LPA-SL

## CASO 1

*Ausência de mutações detetadas ou inferidas em uma qualquer das regiões genômicas incluídas no LPA-SL.*

Todas as bandas WT presentes e nenhuma banda MUT hibridada no LPA-SL.



**Laudo genotípico:**

Resistência não detetada

**Ação de diagnóstico adicional:**

**Opcional:**

- fazer TSA fenotípico à Lfx na CC (p. ex., CC: 1,0 mg/L no MGIT e em 7H10) e/ou à Mfx na CC e no PCC (p. ex., CC: 0,25 mg/L no MGIT e 0,5 mg/L em 7H10; PCC: 1,0 mg/L no MGIT e 2,0 mg/L em 7H10).
- fazer TSA fenotípico para o medicamento ISL de interesse.

A decisão de realizar estas ações opcionais de seguimento deve levar em linha de conta o grupo de risco de resistência a que o paciente pertence (p. ex., exposição prévia a medicamentos SL, suspeita de fracasso do tratamento) e pela prevalência de resistência na localização geográfica específica, dado que estes fatores afetam os valores preditivos do teste.

**Implicações clínicas:**

Dar início ao tratamento da TB-MDR. Rever o regime de tratamento com base em resultados de TSA fenotípico.

## CASO 2

*Deteção de mutações de resistência associadas ao aumento da CIM de alto nível para a Mfx*



Caso esteja presente uma das seguintes sondas MUT:

- *gyrA* MUT3C (ou seja, *gyrA* D94G) (cf. imagem supra a título de exemplo)
- *gyrA* MUT3D (ou seja, *gyrA* D94H)
- *gyrA* MUT3B (ou seja, *gyrA* D94N/Y)

### Laudo genotípico:

Levofloxacina: resistência detetada

Moxifloxacina: mutação detetada associada ao aumento da CIM de alto nível para a Mfx.

### Ação de diagnóstico adicional:

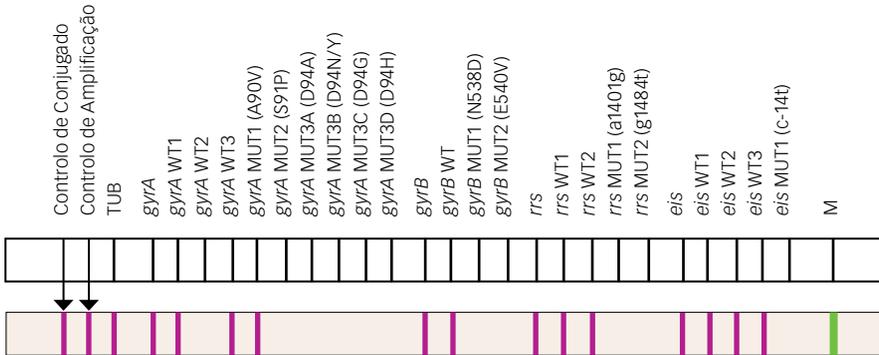
**Opcional:** fazer TSA fenotípico para o medicamento ISL de interesse.

### Implicações clínicas:

Não se pode considerar a Mfx um medicamento eficaz, mesmo em doses elevadas.

### CASO 3

*Mutações detetadas associadas, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx*



Caso esteja presente uma das seguintes sondas MUT:

- *gyrA* MUT1 (ou seja, *gyrA* A90V) (cf. imagem supra a título de exemplo)
- *gyrA* MUT2 (ou seja, *gyrA* S91P)
- *gyrA* MUT3A (ou seja, *gyrA* D94A)
- *gyrB* MUT1 (ou seja, *gyrB* N538D)
- *gyrB* MUT2 (ou seja, *gyrB* E540D)

#### Laudo genotípico:

Levofloxacina: resistência detetada.

Moxifloxacina: detetada mutação associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.

#### Ação de diagnóstico adicional:

**Recomendado:** fazer TSA fenotípico à Mfx no PCC, de acordo com o Caso 1.

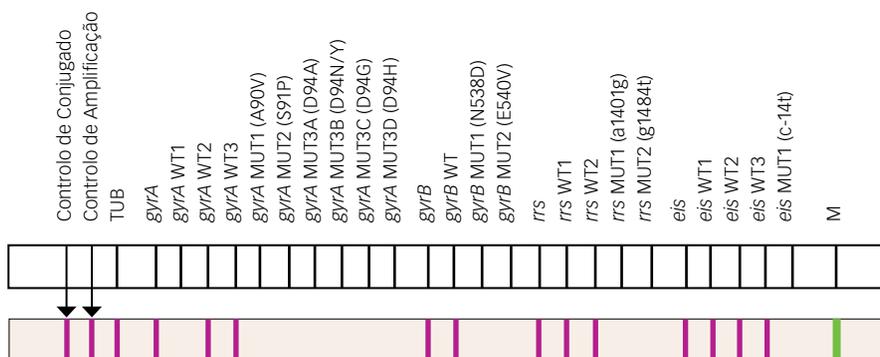
**Opcional:** fazer TSA fenotípico para o medicamento ISL de interesse.

#### Implicações clínicas:

Pode aumentar-se a dose de Mfx. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC.

## CASO 4

*Mutação exata desconhecida, apenas inferida nas regiões das fluoroquinolonas (FQ) (ou seja, gyrA e gyrB)*



Se uma das seguintes bandas WT não estiver presente:

- *gyrA* WT1 (ou seja, sonda *gyrA* WT1 ausente) (cf. imagem supra a título de exemplo),
- *gyrA* WT2 (ou seja, sonda *gyrA* WT2 ausente),
- *gyrA* WT3 (ou seja, sonda *gyrA* WT3 ausente),
- *gyrB* WT (ou seja, sonda *gyrB* WT ausente),

e nenhuma das sondas MUT estiver presente nas regiões *gyrA* e *gyrB*.

### Laudo genotípico:

Levofloxacina: resistência inferida.

Moxifloxacina: mutação inferida associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.

### Ação de diagnóstico adicional:

**Recomendado:** fazer TSA fenotípico à Mfx no PCC, de acordo com o Caso 1.

**Opcional, mas recomendado nalgumas localizações<sup>1</sup>:** sequenciação da RDRQ do *gyrA* e do *gyrB* para identificar a presença de mutação de resistência e excluir mutações sinónimas ou não-sinónimas que não causem resistência (falsos resultados positivos sistemáticos) (interpretar com base nos Casos 2–4 e seguir as respetivas recomendações para TSA fenotípico).

Se a sequenciação não estiver disponível, fazer TSA fenotípico à Lfx e/ou à Mfx na CC, de acordo com o caso 1.

<sup>1</sup> A ausência de ligação de uma sonda WT sem ligação simultânea de uma sonda de mutação é provocada pela presença de uma mutação de resistência (p. ex., *gyrA* G88A). Contudo, é possível que ocorram erros sistemáticos devido a mutações sinónimas e não-sinónimas. Em geral, tal é raro (<1% dos isolados), mas estes isolados podem ser frequentes a nível local. Não sendo possível prever os locais em que esses casos são frequentes, cada laboratório tem de decidir, com base na epidemiologia local, se a sequenciação da região RDRQ é necessária. Por exemplo, a mutação *gyrA* A90G, que impede a ligação da *gyrA* WT2, é frequente na República do Congo e na República Democrática do Congo, enquanto uma mutação sinónima no codão 96 do *gyrA*, que impede a ligação da *gyrA* WT3, é frequente em Medellín (Colômbia) (9). Assim, seria recomendável realizar a sequenciação nestes locais.

**Opcional:** fazer TSA fenotípico para o medicamento ISL de interesse.

### Implicações clínicas:

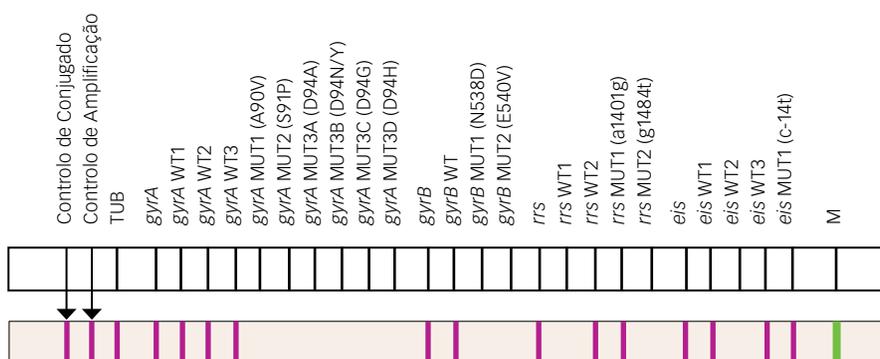
A levofloxacina não é eficaz.

Pode aumentar-se a dose de Mfx. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC.

**Nota:** estas recomendações não se aplicam se a sequenciação, disponível antes do início do tratamento, identificar mutações não associadas a FQ, ou se o TSA fenotípico revelar sensibilidade na CC.

## CASO 5

*Deteção de mutações que conferem resistência a ISL.*



Caso esteja presente uma das seguintes bandas MUT:

- *rrs* MUT1 (ou seja, *rrs* a1401g) (cf. imagem supra a título de exemplo)
- *rrs* MUT2 (ou seja, *rrs* g1484t)
- *eis* MUT1 (ou seja, *eis* c-14t)

### Laudo genotípico:

Em caso de mutações exclusivamente no gene *rrs* ou de mutações nos genes *rrs* e *eis*:

- Amicacina: resistência detetada
- Canamicina: resistência detetada
- Capreomicina: resistência detetada

Em caso de mutação *eis* c-14t exclusivamente:

- Amicacina: resistência não detetada
- Canamicina: resistência detetada
- Capreomicina: resistência não detetada

### Ação de diagnóstico adicional:

**Opcional:** fazer TSA fenotípico a FQ de acordo com o Caso 1.

### Implicações clínicas:

Em caso de mutações exclusivamente no gene *rrs* ou de mutações nos genes *rrs* e *eis*, prevê-se resistência a medicamentos ISL.

Em caso de mutação *eis* c-14t exclusivamente: a amicacina é eficaz.

## CASO 6

### Mutação exata desconhecida, apenas inferida na região *rrs*



Se uma das seguintes bandas WT não estiver presente:

- *rrs* WT1 (sonda *rrs* WT1 ausente) (cf. imagem supra a título de exemplo),
- *rrs* WT2 (sonda *rrs* WT2 ausente),

e nenhuma das sondas MUT estiver presente na região *rrs*.

### Laudo genotípico:

Em caso de mutação na região *rrs* 1400:

- Amicacina: resistência inferida<sup>1</sup>
- Canamicina: resistência inferida
- Capreomicina: resistência inferida

Em caso de mutação na região *rrs* 1484:

- Amicacina: resistência inferida
- Canamicina: resistência inferida
- Capreomicina: resistência inferida

### Ação de diagnóstico adicional:

**Recomendado:** repetir o ensaio e, se o resultado for confirmado, fazer TSA fenotípico à Am.

<sup>1</sup> É impossível identificar a mutação exata porque não há sondas MUT presentes na região *rrs* 1400. Dado que este perfil de bandamento pode ser provocado por uma mutação provavelmente não associada à resistência à Am (p. ex., c1402t), infere-se a resistência ao medicamento até à realização do TSA fenotípico, usando-se o resultado para reavaliar o regime de tratamento.

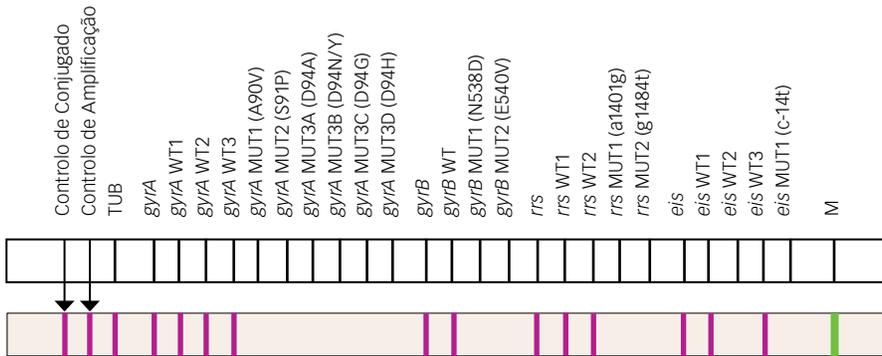
**Opcional:** fazer sequenciação para identificar a mutação exata. Fazer TSA fenotípico a FQ de acordo com o Caso 1.

**Implicações clínicas:**

É provável que a canamicina e a capreomicina não sejam eficazes.

**CASO 7**

*Mutação exata desconhecida, apenas inferida na região eis*



Se uma das seguintes bandas WT não estiver presente:

- *eis* WT1 (sonda *eis* WT1 ausente) (p. ex., *eis* g-37t),
- *eis* WT2 (sonda *eis* WT2 ausente) (p. ex., *eis* c-12t ou g-10a) (cf. imagem supra a título de exemplo),

e nenhuma das sondas MUT estiver presente na região *eis*.

**Laudo genotípico:**

Se forem inferidas mutações em *eis* (e não houver mutações adicionais na região *rrs*):

- Amicacina: resistência não detetada
- Canamicina: resistência inferida
- Capreomicina: resistência não detetada

**Ação de diagnóstico adicional:**

**Opcional:** fazer TSA fenotípico a FQ de acordo com o Caso 1, bem como à Am e à Cm.

**Implicações clínicas:**

A amicacina é provavelmente eficaz.

---

## Referências

1. Miotto, P et al. "A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." *European Respiratory Journal* 50.6 (2017): 1701354.
2. Organização Mundial de Saúde. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Genebra: Organização Mundial de Saúde; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.5). Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.  
[http://www.who.int/tb/publications/2018/WHO\\_technical\\_report\\_concentrations\\_TB\\_drug\\_susceptibility/en/](http://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_technical_report_concentrations_TB_drug_susceptibility/en/)
3. Organização Mundial de Saúde (2018). The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. Genebra: Organização Mundial de Saúde; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.19). Licença: CC BY-NCSA3.0 IGO.  
<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274443/WHO-CDS-TB-2018.19-eng.pdf>.
4. Organização Mundial de Saúde. (2008). Molecular line probe assay for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (TB-MDR). Policy statement. Organização Mundial de Saúde.  
[http://www.who.int/tb/laboratory/line\\_probe\\_assays/en/](http://www.who.int/tb/laboratory/line_probe_assays/en/).
5. Nathavitharana RR, et al. 2016. Multicenter Noninferiority Evaluation of Hain GenoType MTBDR*plus* Version 2 and Nipro NTM+MDRTB Line Probe Assays for Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance. *J Clin Microbiol* 54:1624–1630.
6. Organização Mundial de Saúde. (2016). The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin: policy update. Organização Mundial de Saúde.  
<http://www.who.int/tb/publications/molecular-test-resistance/en/>.
7. Organização Mundial de Saúde. (2016). The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: policy guidance. Organização Mundial de Saúde.  
<http://www.who.int/iris/handle/10665/246131>.
8. GLI model TB diagnostic algorithms (revisto em junho de 2018). Global Laboratory Initiative. 2017.  
[http://stoptb.org/wg/gli/assets/documents/GLI\\_algorithms.pdf](http://stoptb.org/wg/gli/assets/documents/GLI_algorithms.pdf).
9. Ajiloye A, et al. 2017. Some Synonymous and Nonsynonymous *gyrA* Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Lead to Systematic False-Positive Fluoroquinolone Resistance Results with the Hain GenoType MTBDR*s*/ Assays. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
10. Folkvardsen DB, et al. 2013. Can molecular methods detect 1% isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*? *J Clin Microbiol* 51:1596–9.
11. Folkvardsen DB, et al. 2013. Rifampin heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* cultures as detected by phenotypic and genotypic drug susceptibility test methods. *J Clin Microbiol* 51:4220-2.

12. Nathavitharana RR, et al. 2017. Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 49.
13. Theron G, et al. 2016. GenoType® MTBDRs/ assay for resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. *Cochrane Database Syst Rev* 9:CD010705.
14. Hain Lifescience. GenoType MTBDR*plus* VER 2.0 Molecular Genetic Assay for Identification of the *M. tuberculosis* Complex and its Resistance to Rifampicin and Isoniazid from Clinical Specimens and Cultivated samples Instructions for use (junho de 2015).
15. Hain Lifescience. GenoType MTBDRs/ VER 2.0. Molecular Genetic Assay for Identification of the *M. tuberculosis* Complex and its Resistance to Fluoroquinolones and Aminoglycosides/Cyclic Peptides from Sputum Specimens or Cultivated Samples. Instruction for use (junho de 2015).
16. Tagliani E, et al. 2015. Diagnostic Performance of the New Version (v2.0) of GenoType MTBDRs/ Assay for Detection of Resistance to Fluoroquinolones and Second-Line Injectable Drugs: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol* 53:2961-9.
17. WHO treatment guidelines for isoniazid-resistant tuberculosis: Supplement to the WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Geneva: Organização Mundial de Saúde; 2018. Licença: CC BY-NC-SA 3.0  
[http://www.who.int/tb/publications/2018/WHO\\_guidelines\\_isoniazid\\_resistant\\_TB/en/](http://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_guidelines_isoniazid_resistant_TB/en/)
18. Technical report on the critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis (WHO/CDS/TB/2018.5) [Internet]. Geneva, Organização Mundial de Saúde; 2017. Disponível em:  
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260470/1/WHO-CDS-TB-2018.5-eng.pdf>
19. Technical report on the pharmacokinetics and pharmacodynamics (PK/PD) of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis (WHO/CDS/TB/2018.6) [Internet]. Geneva, Organização Mundial de Saúde; 2018. Disponível em:  
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260440/1/WHO-CDS-TB-2018.6-eng.pdf>
20. Rigouts L, et al. 2015. Specific *gyrA* gene mutations predict poor treatment outcome in TB-MDR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71(2):314–23.
21. Lange C, et al. 2018. Perspectives for personalized therapy for patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of internal medicine* [publicação eletrônica anterior à versão impressa].
22. Vadwai V, et al. 2013. Can inhA mutation predict ethionamide resistance? *Int J Tuberc Lung Dis* 17:129–30.
23. Vilchèze C, et al. 2014. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr* 2:MGM2-0014-2013.
24. Organização Mundial de Saúde. Rapid communication: key changes to treatment of multidrug- and rifampicin-resistant tuberculosis (MDR/RR-TB). Licença: CC BY-NC-SA 3.0. [RapidCommunicationMDRTB.pdf](#).
25. Ahmad N, et al. 2018. Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *Lancet* 392:821–834.
26. Rigouts L, et al. 2013. Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for *Mycobacterium tuberculosis* isolates with specific *rpoB* mutations. *J Clin Microbiol* 51:2641-5.
27. Van Deun A, et al. 2013. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard. *J Clin Microbiol* 51:2633-40.

## REFERÊNCIAS

---

28. Shah NS, et al. 2016. Clinical Impact on Tuberculosis Treatment Outcomes of Discordance Between Molecular and Growth-Based Assays for Rifampin Resistance, California 2003–2013. *Open Forum Infect Dis* 3:ofw150.
29. Miotto, P et al. Role of disputed mutations in the *rpoB* gene in the interpretation of automated liquid MGIT culture results for rifampicin susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* (2018): JCM-01599.
30. Seifert M, et al. 2015. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *PLoS One* 10:e0119628.
31. Kandler JL, et al. 2018. Validation of Novel *Mycobacterium tuberculosis* Isoniazid Resistance Mutations Not Detectable by Common Molecular Tests. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
32. Andre E, et al. 2017. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpoB* gene mutations in pathogenic mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* 23:167–172.
33. Camus JC, et al. 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148:2967–73.

# Anexo 1.

## Formato de laudos LPA-PL – Exemplos práticos

Tenha em atenção que a secção «Conclusão» foi incluída por motivos práticos, não devendo fazer parte do laudo do laboratório.

### Exemplo 1

Medicamento	Gene	Mutação	Interpretação	Conclusão
Rif <sup>a</sup>	<i>rpoB</i>	H526Y	Resistência à Rif detetada.	A rifampicina não é eficaz.
H <sup>a</sup>	<i>katG</i>	Mutação(ões) na região do codão 315	Inferida mutação associada ao aumento da CIM de alto nível.	É improvável que a isoniazida seja eficaz, mesmo com doses elevadas.
	<i>inhA</i>	t-8a		
Eto/ Pto	<i>inhA</i>	t-8a	Resistência à Eto/Pto provavelmente detetada.	É provável que a etionamida e a protionamida não sejam eficazes.

### Exemplo 2

Medicamento	Gene	Mutação	Interpretação	Conclusão
Rif	<i>rpoB</i>	Sem mutações detetadas	Resistência à Rif não detetada.	A rifampicina é eficaz.
H <sup>a</sup>	<i>katG</i>	S315T	Detetada mutação associada ao aumento da CIM de alto nível.	A isoniazida não é eficaz, mesmo com doses elevadas.
	<i>inhA</i>	c-15t		
Eto/ Pto	<i>inhA</i>	c-15t	Resistência à Eto/Pto detetada.	A etionamida e a protionamida não são eficazes.

### Exemplo 3

Medicamento	Gene	Mutação	Interpretação	Conclusão
Rif	<i>rpoB</i>	Mutação(ões) nos codões 516–522 (435–441)	Resistência à Rif inferida.	A rifampicina não é eficaz.
H	<i>katG</i>	Sem mutações detetadas	Mutação detetada provavelmente associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível.	É provável que a isoniazida seja eficaz numa dose elevada.
	<i>inhA</i>	t-8c		
Eto/ Pto	<i>inhA</i>	t-8c	Resistência à Eto/Pto provavelmente detetada.	É provável que a etionamida e a protionamida não sejam eficazes.

<sup>a</sup> Se houver mais do que uma sonda por medicamento a proporcionar informações, os resultados devem ser comunicados de acordo com a seguinte hierarquia (o sinal ">" significa «invalida»):  
*Para a H:* Mutação detetada associada ao aumento da CIM de alto nível > Mutação inferida associada ao aumento da CIM de alto nível > Mutação detetada associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível > Mutação inferida associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível > Resistência não detetada.  
*Para a Rif:* Resistência detetada > Resistência inferida > Resistência não detetada.

---

## Anexo 2.

### Formato de laudos LPA-SL – Exemplos práticos

Tenha em atenção que a secção «Conclusão» foi incluída por motivos práticos, não devendo fazer parte do laudo do laboratório.

#### Exemplo 1

Medicamento	Gene	Mutação	Interpretação	Conclusão
Lfx <sup>a</sup>	<i>gyrA</i>	D94A	Resistência à Lfx detetada.	A levofloxacina não é eficaz. Pode usar-se moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC.
	<i>gyrB</i>	Sem mutações		
Mfx <sup>a</sup>	<i>gyrA</i>	D94A	Mutação detetada associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	
	<i>gyrB</i>	Sem mutações		
Km <sup>a</sup>	<i>rrs</i>	a1401g	Resistência à Km detetada.	
	Promotor eis	Mutação(ões) na região -10 a -15		
Am	<i>rrs</i>	a1401g	Resistência à Am detetada.	
Cm	<i>rrs</i>	a1401g	Resistência à Cm detetada.	

#### Exemplo 2

Medicamento	Gene	Mutação	Interpretação	Conclusão
Lfx	<i>gyrA</i>	A90V	Resistência à Lfx detetada.	A levofloxacina não é eficaz. Pode usar-se moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC.
	<i>gyrB</i>	Sem mutações		
Mfx	<i>gyrA</i>	A90V	Detetada mutação associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	
	<i>gyrB</i>	Sem mutações		
Km	<i>rrs</i>	Sem mutações	Resistência à Km inferida.	
	Promotor eis	Mutação(ões) na região -37		
Am	<i>rrs</i>	Sem mutações	Resistência à Am não detetada.	
Cm	<i>rrs</i>	Sem mutações	Resistência à Cm não detetada.	

Exemplo 3

Medicamento	Gene	Mutação	Interpretação	Conclusão
Lfx	<i>gyrA</i>	Mutação(ões) no codão 89–93	Resistência à Lfx inferida	A levofloxacina não é eficaz. Pode usar-se moxifloxacina numa dose superior. O regime deve ser reavaliado com base em resultados de TSA fenotípico no PCC.
	<i>gyrB</i>	Sem mutações		
Mfx	<i>gyrA</i>	Mutação(ões) no codão 89–93	Inferida mutação associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível para a Mfx.	<b>Nota:</b> estas recomendações não se aplicam se a sequenciação, disponível antes do início do tratamento, identificar mutações não associadas a FQ, ou se o TSA fenotípico revelar sensibilidade na CC.
	<i>gyrB</i>	Sem mutações		
Km	<i>rrs</i>	Sem mutações	Resistência à Km não detetada	A canamicina é eficaz. A amicacina é eficaz. A capreomicina é eficaz.
	Promotor eis	Mutação(ões) na região -2		
Am	<i>rrs</i>	Sem mutações	Resistência à Am não detetada	
Cm	<i>rrs</i>	Sem mutações	Resistência à Cm não detetada	

<sup>a</sup> Se houver mais do que uma sonda por medicamento a proporcionar informações, os resultados devem ser comunicados de acordo com a seguinte hierarquia (o sinal ">" significa «invalida»):  
*Para a Lfx, a Am, a Km e a Cm:* Resistência detetada > Resistência inferida > Resistência não detetada.  
*Para a Mfx:* Mutação detetada associada ao aumento da CIM de alto nível > Mutação detetada associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível > Mutação inferida associada, pelo menos, ao aumento da CIM de baixo nível > Resistência não detetada.

---

## Anexo 3.

### Alterações nucleotídicas específicas detetadas por sondas MUT

Tenha em atenção que algumas das alterações de aminoácidos (AA) identificadas por LPA-PL e LPA-SL são oriundas de alterações nucleotídicas que não são especificamente reconhecidas pelas sondas MUT. Por exemplo, a mutação A90V no *gyrA* é oriunda de duas alterações nucleotídicas possíveis, a saber, (i) gcg>gtg ou (ii) gcg>gtc. No entanto, apenas a primeira alteração nucleotídica (gcg>gtg) será reconhecida pela sonda *gyrA* MUT1, ao passo que a segunda (gcg>gtc) só será detetada pela ausência da *gyrA* WT2 (ou seja, *gyrA* WT2 não detetada).

	Sonda MUT	Alteração AA	Alteração nucleotídica
Sondas <i>rhoB</i> MUT	MUT1	D516V (D435V)	gac>gtc
	MUT2A	H526Y (H445Y)	cac> tac
	MUT2B	H526D (H445D)	cac> gac
	MUT3	S531L (S450L)	tcg>ttg

	Sonda MUT	Alteração AA	Alteração nucleotídica
Sondas <i>katG</i> MUT	MUT1	S315T	agc>acc
	MUT2	S315T	agc>aca

	Sonda MUT	Alteração AA	Alteração nucleotídica
Sondas <i>gyrA</i> MUT	MUT1	A90V	gcg>gtg
	MUT2	S91P	tcg>ccg
	MUT3A	D94A	gac>gcc
	MUT3B	D94N	gac>aac
	MUT3B	D94Y	gac>tac
	MUT3C	D94G	gac>ggc
	MUT3D	D94H	gac>cac

	Sonda MUT	Alteração AA	Alteração nucleotídica
Sondas <i>gyrB</i> MUT	MUT1	N538D (N499D)	aac>gac
	MUT2	E540V (E501V)	gaa>gta



[www.stoptb.org/wg/gli](http://www.stoptb.org/wg/gli)