



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

GABRIEL DORNELAS GUIMARÃES

**ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO GENÔMICO COMPLETO DE CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis COMO FERRAMENTA DE PREDIÇÃO DE
RESISTÊNCIA A DROGAS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Recife

2024

GABRIEL DORNELAS GUIMARÃES

**ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO GENÔMICO COMPLETO DE CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis COMO FERRAMENTA DE PREDIÇÃO DE
RESISTÊNCIA A DROGAS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira

Co-orientadores: Wlisses Henrique Veloso de Carvalho da Silva

Lílian Maria Lapa Montenegro

Recife

2024

Guimarães, Gabriel Dornelas.

Análise do sequenciamento genômico completo de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* como ferramenta de predição de resistência a drogas do tratamento da tuberculose / Gabriel Dornelas Guimarães. - Recife, 2024.

118f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2024.

Orientação: Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira.

Coorientação: Wlisses Henrique Veloso de Carvalho da Silva.

Coorientação: Lílian Maria Lapa Montenegro.

Inclui referências.

1. Sequenciamento Completo do Genoma; 2. Tuberculose Multidroga Resistente; 3. Testes de Sensibilidade Microbiana. I. Nogueira, Mariane Cajubá de Britto Lira. II. Silva, Wlisses Henrique Veloso de Carvalho da. III. Montenegro, Lílian Maria Lapa. IV. Título.

GABRIEL DORNELAS GUIMARÃES

**ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO GENÔMICO COMPLETO DE CEPAS DE
Mycobacterium Tuberculosis COMO FERRAMENTA DE PREDIÇÃO DE
RESISTÊNCIA A DROGAS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rafael Lima Guimarães (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Heidi Lacerda Alves da Cruz (Examinador Externo)
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Recife

2024

À graça divina e a todos que confiaram no meu potencial,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Dr^a. Mariane Cajubá e meus coorientadores Dr^a. Lílian Montenegro e Dr. Wlisses Veloso, por toda a colaboração do início ao fim do projeto, essenciais para seu desenvolvimento.

Ao Laboratório de Imunoepidemiologia (LIE) e todos os seus integrantes, por todo o acolhimento, me guiando pelos caminhos da ciência e seu mundo tão extraordinário.

Ao Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães e todos os técnicos que auxiliaram no processo.

Ao CNPQ por me proporcionar a oportunidade de atuar como um pesquisador de pós-graduação, podendo retribuir à sociedade tudo que me foi proporcionado.

À minha família em especial minha mãe, Edjane, que sempre esteve ao meu lado, sendo um exemplo de persistência e resiliência.

À Universidade Federal de Pernambuco por me acolher como graduando e pós-graduando, proporcionando a mim experiências fundamentais na minha formação profissional e pessoal.

Aos meus amigos dentro e fora da faculdade que estiveram ao meu lado durante todo o processo, dando apoio e motivação, sendo pilares para chegar até aqui.

Dedico um agradecimento especial a pessoas que foram meus alicerces para não desistir e persistir sempre. Gabriela, Gabriel. A vocês, minha gratidão eterna.

Gostaria de destacar todos meus companheiros entre amigos, família, aliados e relacionados, que, de alguma forma importante, contribuíram para minha formação como pessoa, nunca me deixando abaixar a cabeça, todos tendo uma parte do mérito de hoje eu estar aqui.

Obrigado.

RESUMO

O tratamento eficaz da tuberculose (TB) continua sendo um desafio significativo para a saúde pública, especialmente diante da crescente resistência a medicamentos. Os testes fenotípicos de sensibilidade a drogas (TSDs) permanecem como o padrão-ouro para identificar resistência, porém apresentam limitações em termos de tempo e na gama de fármacos analisados. Métodos genotípicos, como o Xpert MTB/RIF Ultra, oferecem detecção rápida de resistência, mas apresentam restrições em termos de precisão e cobertura de todas as drogas anti-TB. O sequenciamento completo do genoma (WGS) surge como uma alternativa promissora, ao permitir uma análise abrangente dos mecanismos genéticos de resistência, identificando mutações que podem não ser detectadas por métodos convencionais. Neste estudo, analisamos 30 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas aleatoriamente do Laboratório Central de Pernambuco, utilizando o teste fenotípico MGIT 960 para mapear seus perfis de resistência. Destas, 27 amostras foram submetidas ao teste molecular rápido Xpert MTB/RIF Ultra, e 20 passaram pelo sequenciamento pelo MiSeq V3-600 (Illumina). Uma cepa foi identificada como *M. kansasii* e, portanto, excluída da análise. Com cobertura genômica superior a 99%, a análise dos dados foi conduzida com o auxílio da plataforma TBProfiler, garantindo robustez nos resultados. Os testes revelaram uma concordância de 90% entre os resultados fenotípicos e o WGS para resistência à isoniazida (INH) e rifampicina (RIF), que são essenciais na definição da multirresistência. Para o etambutol (EMB), a concordância foi de 70%, com seis amostras classificadas como resistentes pelo WGS. No entanto, quatro cepas fenotipicamente resistentes à estreptomicina (SM) não foram corretamente identificadas pelo WGS, resultando em uma concordância de 85%. No que diz respeito à resistência à RIF, o Xpert MTB/RIF Ultra apresentou uma sensibilidade de 93% em comparação com o teste fenotípico. A análise comparativa permitiu classificar duas cepas como pré-XDR e XDR, posteriormente confirmadas como MDR pelo MGIT. Além disso, o WGS identificou duas cepas como MDR, embora tenham sido classificadas como RIF resistente e monorresistente no teste fenotípico. Esses resultados demonstram o potencial do WGS em fornecer perfis de resistência mais completos e precisos, oferecendo uma base sólida para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes em áreas com alta incidência de TB.

Palavras-chave: Sequenciamento Completo do Genoma, Tuberculose Multidroga Resistente, Testes de Sensibilidade Microbiana.

ABSTRACT

Effective tuberculosis (TB) treatment remains a significant challenge in public health, especially in the context of drug resistance. Phenotypic drug susceptibility tests (DSTs) continue to be the gold standard for identifying resistance, but they have limitations in terms of time and the range of drugs tested. Genotypic methods, such as the Xpert MTB/RIF Ultra, offer rapid detection of resistance but have limitations in accuracy and coverage of all anti-TB drugs. Whole genome sequencing (WGS) offers a comprehensive analysis of the genetic mechanisms of resistance, identifying mutations that may not be detected by conventional methods. In this study, we analyzed 30 *Mycobacterium tuberculosis* strains randomly isolated from the Central Laboratory of Pernambuco using the phenotypic MGIT 960 DST to map their resistance profiles. Of these, 27 samples were subjected to the rapid molecular Xpert MTB/RIF Ultra test and 20 to sequencing by MiSeq V3-600 (Illumina). One strain was identified as *M. kansasii* and was therefore removed from the analysis. Genomic coverage of over 99% enabled robust data analysis using the TBProfiler platform. The analyses revealed a 90% concordance rate between phenotypic and WGS results for resistance to isoniazid (INH) and rifampicin (RIF), the drugs that define multidrug resistance. For ethambutol (EMB), concordance was 70%, with six samples identified as resistant by WGS, while four strains with phenotypic resistance to streptomycin (SM) were not correctly identified by sequencing, resulting in 85% concordance. In the isolated analysis of RIF resistance, the Xpert MTB/RIF Ultra showed a sensitivity of 93% compared to the phenotypic test. The comparative analysis of the results correctly classified two strains as pre-XDR and XDR, which were later confirmed as MDR by the MGIT. Additionally, two strains were identified as MDR by WGS, although they were classified as RIF-resistant and monoresistant by the phenotypic test. Thus, WGS has the potential to infer resistance profiles, providing a more comprehensive and agile basis for formulating effective treatments in TB high-burden areas.

Keywords: Whole Genome Sequencing, Multidrug-Resistant Tuberculosis, Microbial Sensitivity Tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estimativa da Incidência global da TB no ano de 2022.	22
Figura 2 – Coeficiente de incidência de TB (casos por 100 mil hab.) por Unidades da Federação do Brasil em 2022.....	23
Figura 3 – Eletromicrografia da célula do <i>M. tuberculosis</i>	24
Figura 4 – Diagrama dos componentes básicos da parede celular micobacteriana.	25
Figura 5 – Representação esquemática dos aspectos imunológicos associados à infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e seus desfechos.	28
Figura 6 – Mapa do cromossomo circular do <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	37
Figura 7 – Árvore filogenética com máxima verossimilhança e distribuição das linhagens.	39
Figura 8 – Fluxograma de processamento do ensaio Xpert MTB/RIF.....	52
Figura 9 – Visão geral das várias tecnologias NGS com diferentes princípios e plataformas.	55
Figura 10 – Metodologia para sequenciamento completo do genoma de isolados do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema Básico para o tratamento da TB em adultos e adolescentes ($\geq$ 10 anos de idade): 2RHZE/4RH.	34
Tabela 2 – Medicamentos de segunda linha para o tratamento da TB-DR.	35
Tabela 3 – Mutações de resistência frequentemente associadas à resistência a drogas encontradas em isolados clínicos de MTB.	45
Tabela 4 – Catálogo da WHO com os Fármacos, Genes e Mutações utilizadas na análise dos dados de sequenciamento para predição de resistência genotípica as drogas anti-TB.	69
Tabela 5 – Perfil de resistência das cepas TB-DR provenientes do LACEN-PE de acordo com o método MGIT.	72
Tabela 6 – Detecção da presença de DNA micobacteriano e perfil de resistência à RIF em amostras analisadas pelo Teste Rápido Molecular Xpert MTB/RIF Ultra	73
Tabela 7 – Representação da qualidade dos dados de sequenciamento e mapeamento das reads de algumas das cepas TB-DR de Pernambuco comparado ao genoma do MTB (H37Rv).	76
Tabela 8 – Predição da resistência genotípica as drogas anti-TB de cepas de MTB através da análise por (WGS).	78
Tabela 9 – Resultados dos testes laboratoriais analisados para detecção da resistência à RIF e INH das cepas <i>Mtb</i> -DR (MGIT; Sequenciamento WGS e Xpert MTB-RIF).	81
Tabela 10 – Perfis de resistência das cepas quanto às análises fenotípica (MGIT) e genotípica (WGS).	83
Tabela 11 – Linhagem filogenética de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> analisadas no estudo.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AMK	Amicacina
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacilo <i>Calmette-Guérin</i>
BDQ	Bedaquilina
BK	Bacilo de Koch
CAP	Capreomicina
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
COVID-19	<i>Coronavirus Disease</i>
EMB	Etambutol
ETO	Etionamida
FQs	Fluoroquinolonas
GC	<i>Growth control</i>
GU	<i>Growth unit</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
INH	Isoniazida
ILTB	Infecção por Tuberculose Latente
KAN	Canamicina
LACEN-PE	Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco
LJ	Meio de cultura <i>Lowenstein-Jensen</i>
LPA	<i>Line Probe Assay</i>
LVX	Levofloxacino
LZD	Linezolida
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MGIT	<i>Mycobacterium Growth Indicator Tube</i>
MXF	Moxifloxacino
NGS	<i>New Generation Sequencing</i>
PZA	Pirazinamida
pb	Pares de base
qPCR	Cadeia da Polimerase em tempo real
RIF	Rifampicina

rRNA	RNA Ribossômico
SM	Estreptomicina
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TB	Tuberculose
TB-DR	Tuberculose Droga Resistente
TB-pré-XDR	Tuberculose pré Extensivamente Resistente a Drogas
TB-MDR	Tuberculose Multidrogarresistente
TB-RR	Tuberculose Rifampicina Resistente
TB-XDR	Tuberculose Extensivamente resistente a drogas
TRM	Teste Rápido Molecular
TSD	Teste de Sensibilidade a Drogas
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 TUBERCULOSE	19
2.1.1 Histórico da Tuberculose	19
2.1.2 Epidemiologia	21
2.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
2.2.1 Características gerais	24
2.2.2 Transmissão	26
2.2.3 Imunopatologia e fisiopatologia	27
2.2.4 Diagnóstico	30
2.2.5 Tratamento	32
2.2.5.1 Tratamento da TB sensível a medicamentos	33
2.2.5.2 Tratamento da TB resistente a medicamentos	34
2.2.6 Genoma	36
2.2.7 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
2.2.8 Diversidade Genética do CMTB	40
2.2.9 Tuberculose Droga Resistente (TB-DR)	42
2.3 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE MTB	47
2.3.1 Tubo indicador de crescimento micobacteriano (MGIT)	49
2.3.2 Xpert MTB/RIF e Xpert MTB/RIF Ultra	51
2.3.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	53
2.3.4 Sequenciamento de Genoma Completo (WGS)	56
3 OBJETIVOS	63
3.1 OBJETIVOS GERAL	63
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
4 MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.1. MICRORGANISMO	64
4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE ÀS DROGAS ANTI-TB FENOTÍPICO	64
4.3 XPERT MTB/RIF ULTRA	66
4.4 INATIVAÇÃO DAS CEPAS DE MTB E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	66
4.5 SEQUENCIAMENTO DE GENOMA COMPLETO (WGS)	67
4.6 BIOINFORMÁTICA	67
4.7 PREDIÇÃO DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA A DROGAS E DETERMINAÇÃO DA LINHAGEM POR CLUSTERING	68

5 RESULTADOS	71
5.1 PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS CEPAS TUBERCULOSE DROGA RESISTENTE (TB-DR) DE ACORDO COM TESTE MGIT	71
5.2 DETECÇÃO DA PRESENÇA DO MTB E DE RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA PELO TRM XPERT MTB/RIF ULTRA.....	73
5.3 SEQUENCIAMENTO DE GENOMA COMPLETO (WGS) E MAPEAMENTO DE READS.....	74
5.4. ANÁLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES METODOLOGIAS NA DETECÇÃO DE TB-MDR	80
5.5 ANÁLISE DE CLUSTERS E DETERMINAÇÃO DAS LINHAGENS FILOGENÉTICAS DAS CEPAS DE DR-MTB	84
6 DISCUSSÃO	86
7 CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa multissistêmica causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). Com um modelo epidemiológico característico de transmissão e persistência da infecção no hospedeiro, a TB continua sendo uma preocupação de saúde pública global, apesar da disponibilidade de diversos tratamentos (WHO, 2023). Isso ocorre devido às suas altas taxas de morbidade, uma vez que afeta uma grande porção da população mundial, com sua concentração majoritariamente entre países de baixa renda (Miggiano; Rizzi; Ferraris, 2020).

Atualmente, a TB é a segunda maior causa de mortalidade dentre as doenças causadas por um único agente infeccioso, ficando apenas atrás da COVID-19, e causando aproximadamente o dobro de mortes causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (do inglês: *human immunodeficiency virus* – HIV). Pacientes com infecção por tuberculose (TB) têm um risco de 5 a 10% ao longo da vida de desenvolver a doença, risco esse que aumenta em diferentes estados de imunodeficiência, chegando a até 16% de risco anual de ativação da infecção por TB em doença de TB em pacientes com HIV (Gill et al., 2022).

Apesar de ser prevenível e curável, mais de 10 milhões de pessoas são acometidas pela tuberculose todo ano. (WHO, 2023). A incidência da TB no mundo, em 2022, foi em torno de 10.6 milhões de casos totais. Desde número, 7.5 milhões foram novos diagnósticos. Estima-se um total de, 1.3 milhões de mortes no mesmo ano pela doença. Este número está muito distante do planejado pela estratégia End TB, que, dentre os desafios, visava uma redução do número de mortes por TB em 75% entre os anos de 2015 e 2025. Em 2022, esta taxa permanece em 19% (WHO, 2023).

O Brasil permanece entre lista dos 30 países com maior carga de TB do mundo, e na lista dos doze países com maior incidência da coinfeção TB/HIV gerando uma preocupação entre as autoridades de saúde. (WHO, 2023). Dados preliminares do Boletim Epidemiológico 2024 mostraram que 80.012 novos casos foram contabilizados pelo Ministério da Saúde em 2023. No ano de 2022, a TB levou à óbito 5.845 pessoas (2,72 óbitos a cada 100 mil hab.) (Brasil, 2023).

Em Pernambuco, 2022 registrou 5.026 novos casos de tuberculose e 367 óbitos, com Recife sendo a quarta capital brasileira com mais casos (1.637). Do total de novos casos no estado, 54 foram de tuberculose resistente a medicamentos (TB-DR). No Brasil, foram notificados 1.060 casos novos de TB-DR (Brasil, 2024).

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são essenciais para a eficácia dos programas públicos de controle da doença, os quais buscam curar o paciente e evitar a transmissão do bacilo para a comunidade (Huf; Kritski 2012 Coll et al., 2015). Devido à sua construção celular única e ao ciclo de vida peculiar, o tratamento da doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) é prolongado, o que, por sua vez, leva a não-adesão ao regime terapêutico (Peloquin; Davies, 2021). Quer seja por abandono devido a longa duração ou efeitos adversos dos antibióticos, estes são importantes fatores de risco para o desenvolvimento da resistência na tuberculose (Natarajan et al, 2020; WHO 2023).

A tuberculose resistente a medicamentos continua a ser uma ameaça à saúde pública. A resistência à RIF – o medicamento de primeira linha mais eficaz – é a maior preocupação. A TB resistente a RIF e a INH são definidas como TB multirresistente (TB-MDR). Tanto a TB-MDR quanto a TB resistente à RIF (TB-RR) requerem tratamento com medicamentos de segunda linha como fluoroquinolonas ou medicamentos injetáveis (WHO, 2023). A detecção precoce, tratamento eficaz e monitoramento contínuo da resistência aos medicamentos da TB são cruciais para combater sua propagação e orientar intervenções de saúde pública (Sun et al., 2022; WHO, 2022).

Mesmo com limitações como o crescimento lento do MTB (3 a 4 semanas), testes de sensibilidade à drogas (TSDs) fenotípicos baseados em cultura permanecem como o padrão-ouro para a detecção da resistência (Tortora, 2017; Sun et al., 2017). Métodos moleculares como o Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, EUA) e os ensaios de sonda em linha GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, Alemanha) aumentaram consideravelmente o TSDs e reduziram o tempo de obtenção dos resultados (Iketeleng et al., 2018). No entanto, esses métodos fornecem informações de resistência para um número limitado de medicamentos, e não são capazes de fornecer predições acerca do perfil de resistência à todas as drogas do tratamento da TB (Iketeleng et al., 2018).

Quanto à sua genética, devido à clonalidade de seus genomas e à incapacidade de passar por transferência lateral de genes, as cepas do CMTB adquirem resistência a medicamentos principalmente por meio de variantes em genes vitais ou promotores (Meehan et al., 2019; Lam et al., 2023). Muitas vezes associados a mutações espontâneas, especialmente polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs) em seu único cromossomo circular (McGrath et al., 2015; Meehan et al., 2019).

O sequenciamento de nova geração NGS é uma nova tecnologia para sequenciamento de DNA e RNA e detecção de variantes/mutações como SNPs. Esta tecnologia combina as vantagens de químicas de sequenciamento exclusivas, diferentes matrizes de sequenciamento e tecnologia de bioinformática, permitindo a identificação do agente etiológico exato e até mutações de resistência a antibióticos (Satam et al., 2023). Tal combinação permite um sequenciamento paralelo em massa de várias extensões de sequências de DNA ou RNA ou mesmo genoma completo em um período relativamente curto. (Qin, 2019).

O sequenciamento do genoma completo (WGS) de patógenos bacterianos está revolucionando a microbiologia tradicional. Uma das principais vantagens da análise de todo o genoma habilitada para WGS em relação aos testes genômicos convencionais é a capacidade de reconhecer mutações infrequentes e novas associadas à resistência fenotípica, de forma que relacionem com os resultados dos testes fenotípicos (Lam et al., 2021; He et al, 2020).

A associação entre as informações do WGS e os resultados do tratamento de pacientes com TB-MDR ainda é debatida (He et al., 2020). Neste estudo, apresentamos os resultados de detecção da resistência do TSD fenotípico, utilizando cultura MGIT 960, e os TSDs moleculares Xpert MTB/RIF Ultra e WGS em isolados clínicos do Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE). Avaliamos a performance do WGS na predição do perfil genotípico de resistência e comparamos com os perfis obtidos pelos outros métodos, visando validar a metodologia e sua aplicabilidade na prática clínica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TUBERCULOSE

2.1.1 Histórico da Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma das patologias mais antigas datadas pela humanidade. À luz da história, corroborando com pesquisas históricas e arqueológicas, estima-se que os membros do gênero *Mycobacterium* tenham surgido há mais de 150 mil anos causando infecções desde os tempos antigos. Especula-se que a espécie de origem africana *M. canettii* seja o ancestral comum do diverso gênero atual, o qual se diversificou a partir do acúmulo de mutações oriundas das replicações por expansão clonal deste ancestral (Gutierrez et al., 2005; Coll et al., 2014; Barberis et al., 2017).

Os vestígios arqueológicos mais antigos mostram que os primeiros casos de TB, conhecida como o "Mal de Pott" – forma de acometimento vertebral da TB –, datam desde 5000 anos a. C., sendo encontradas lesões características da doença em múmias egípcias, e vestígios de material genético análogo ao bacilo (Daniel; 2000). Na América do Sul, um caso de uma múmia peruana, com 1100 anos de idade, revelou o primeiro acometimento encontrado de TB pulmonar no continente, onde fragmentos de tecidos foram estudados através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) confirmando a presença de sequências compatíveis com o DNA do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (Rosemberg, 1999; Daniel, 2000).

A perspectiva atual sustenta que o processo de sobrevivência e evolução do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) foi fundamentado em um fator-chave de sobrevivência compartilhado entre os protozoários de vida livre. Esse fator contribuiu para o desenvolvimento da habilidade do patógeno de se multiplicar em macrófagos de mamíferos, considerado sua principal característica de virulência (Jang et al., 2008; Vanderven et al., 2016). Estudos evidenciam que a propagação de MTB na espécie humana foi originária a partir da dominação do fogo, onde houve um aumento da interação social, e pequenos danos ao pulmão induzidos pela fumaça, abrindo espaços para a infecção micobacteriana (Chisholm et al., 2016).

Pioneiramente, em 1720, a origem infecciosa da TB foi arquitetada pelo físico Benjamin Marten na sua publicação "*A new theory of Consumption*", em que trouxe uma visão epidemiológica abrangente para a época. O relato do pesquisador evidencia uma forma de transmissão da TB semelhante à atualmente conhecida. Já na metade do século XIX, o termo "tuberculose" foi utilizado pela primeira vez para Referir-Se À Doença (Daniel, 2000b). Contudo, Apenas Durante A Revolução Industrial, diante das condições sociais e de trabalho precárias, a "praga branca" – termo utilizado para a denominação da doença na Europa devido à aparência pálida das pessoas infectadas – transformou-se na origem de uma epidemia no continente, elevando a TB a um estado de emergência, e caracterizando a importância em saúde pública da doença (Frith, 2014).

No Brasil, os colonizadores portugueses infectados, em contato com os indígenas nativos, foram a causa de diversos adoecimentos e mortes pela TB. Acredita-se que o Padre Manuel da Nóbrega tenha sido o primeiro indivíduo infectado a chegar ao país (Campos; Pianta, 2001). Apesar das medidas sanitárias para o controle da TB terem sido criadas durante o período imperial, os efeitos que ocorreram na Europa também acometeram o Brasil, que se via diante de uma epidemia da doença atrelada às condições sociais precárias, trazendo à tona o termo "a praga dos pobres" (Ruffino-Netto; Pereira, 1981; Sheppard, 2001). Devido ao cenário de segregação social, e a falta de medidas sanitárias voltadas para a população marginalizada, a TB se tornou a principal causa de morte do Rio de Janeiro no final do século XIX (Basta, 2006).

Com o advento de estratégias para elucidação e controle da TB, como o isolamento do bacilo por Robert Koch em 1882, a vacina desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin em 1921 (conhecida como BCG – Bacilo de Calmette e Guérin), e fármacos anti-TB como a SM descoberta em 1943, a situação no início do século XX recebeu maior atenção. A significativa Reforma Carlos Chagas em 1920 e a atuação pioneira da Liga Brasileira Contra a Tuberculose na vacinação com a BCG foram fundamentais no cuidado aos infectados por essa enfermidade emergente (Maciel, 2012; Barberis et al., 2017).

A situação voltou a ser uma preocupação mundial no século X, devido à pandemia de HIV/ que se instalou na década de 1980, resultando em um aumento significativo de casos de coinfeção TB/HIV (Bañuls et al, 2015). Além disso, o surgimento de cepas resistentes, como a TB multidroga resistente (TB-MDR) e a extensivamente resistente (XDR-TB), criou uma emergência da doença que ainda permanece atualmente (WHO, 2023). Para controlar a situação, o plano "END-TB" da Organização Mundial da Saúde (WHO) reúne estratégias com os órgãos nacionais dos países afiliados, visando o controle da TB até 2035 (WHO, 2023).

2.1.2 Epidemiologia

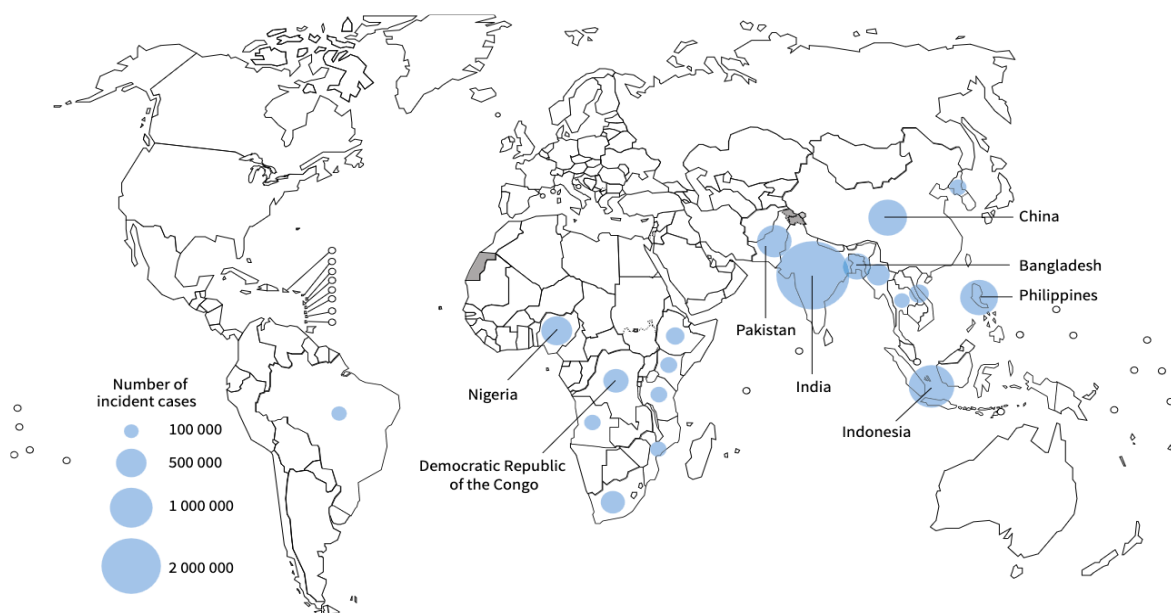
Apesar das medidas preventivas e tratamentos disponíveis, a luta contra a tuberculose (TB) continua a ser um grande desafio para a saúde pública global. Em 2019, a TB foi a 13^a causa de morte no mundo e, em 2022, tornou-se a segunda maior causa de morte por um único agente infeccioso, apenas atrás da COVID-19. Nesse ano, 7,5 milhões de pessoas foram diagnosticadas com a doença, o maior número desde que a WHO começou a monitorar os casos em 1995. Entre os casos registrados, 6,3% eram de coinfeção TB/HIV, sendo que essa cifra reflete a subnotificação durante a pandemia de 2020 (WHO, 2023).

Globalmente, cerca de 10,6 milhões de pessoas adoeceram de TB em 2022, com 1,3 milhões levando à morte. Entre as mortes de pessoas vivendo com HIV/AIDS, 81% ocorreram na África e no sudeste asiático, com a Índia responsável por 29% dos casos. Os 30 países com maior carga de TB representam 87% dos casos, incluindo o Brasil. Os oito países mais afetados concentram cerca de dois terços do total; a Índia (27%), Indonésia (10%) e China (7,1%) são os mais críticos (WHO, 2023) (Figura 1). Na América, foram estimados 291 mil casos de TB em 2020, resultando em aproximadamente 27 mil mortes, ainda distantes da meta do plano END-TB da WHO, que era de 16,3 mil (PAHO, 2021).

Dados do boletim epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil de 2024 revelam uma taxa de 37,0 casos de TB a cada 100 mil habitantes de novos casos de TB em 2023 (80.012 casos). Nota-se uma recuperação no que diz respeito ao diagnóstico, que foi prejudicado pela pandemia da COVID-19, a qual acarretou num decréscimo de 12,1% de casos diagnosticados entre o ano de 2019 e 2020. (Brasil, 2024).

Dentre os estados com maior carga de casos no ano de 2022, destacam-se em ordem decrescente Roraima (85,7 casos por 100 mil hab.), Amazonas (81,6 casos por 100 mil hab.), e Rio de Janeiro (70,7 casos por 100 mil hab.) e Pernambuco (51,5 casos por 100 mil hab.). Estas e outras 11 federações tiveram o coeficiente de incidência superior ao do país (Figura 2) (Brasil, 2024).

Figura 1 - Estimativa da Incidência global da TB no ano de 2022.



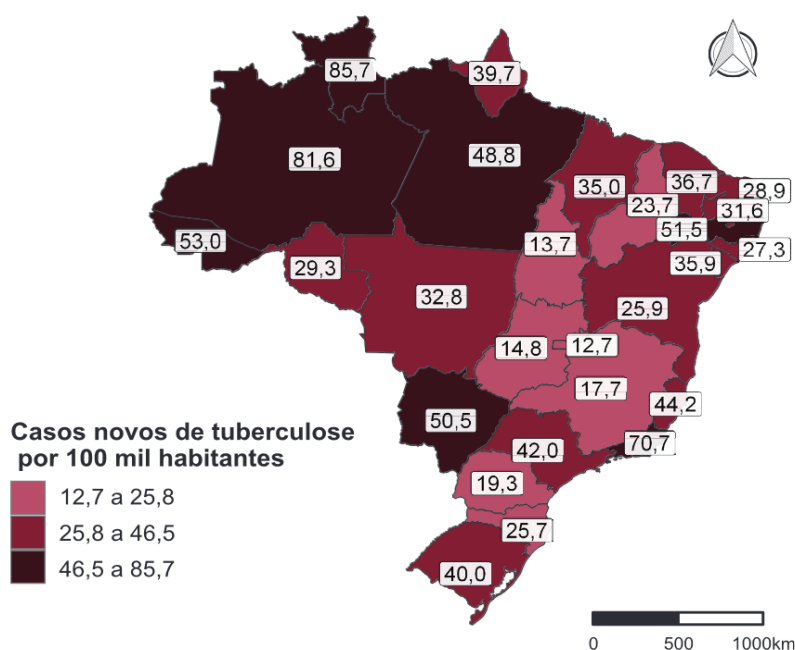
Fonte: WHO, 2023

O coeficiente de mortalidade no Brasil havia entrado em redução há aproximadamente duas décadas. Porém, esta tendência se reverteu no ano de 2021, quando o número de óbitos alcançou a marca de 5.072, 10,7% maior que no ano de 2019 (4.531) (Brasil, 2024). Acerca dos estados com maior risco de mortalidade por TB, Pernambuco se encontra em quarto lugar em 2022, com um quantitativo de 3,8 óbitos por 100 mil habitantes. Entre as capitais do Brasil, Recife está na terceira

colocação entre as capitais com maior mortalidade contabilizando 99 óbitos (6 a cada 100 mil hab.) (Brasil, 2024).

Em todo o mundo, no ano de 2022, estimou-se que em torno de 410 mil pessoas desenvolveram TB-MDR ou TB-RR, corroborando com o fato da emergência mundial no controle desta situação. Já no Brasil, entre 2019 e 2022, 3.960 casos de TB resistente foram registrados, destes 1.060 apenas em 2022 (Brasil, 2024) trazendo assim a necessidade de maior atenção no país, uma vez que o Brasil somou 23% dos registros de TB resistente na América do Sul no ano de 2020 (881) ficando atrás apenas do Peru (32%) (PAHO, 2021).

Figura 2 - Coeficiente de incidência de TB (casos por 100 mil hab.) por Unidades da Federação do Brasil em 2022.



Fonte: Brasil, 2024

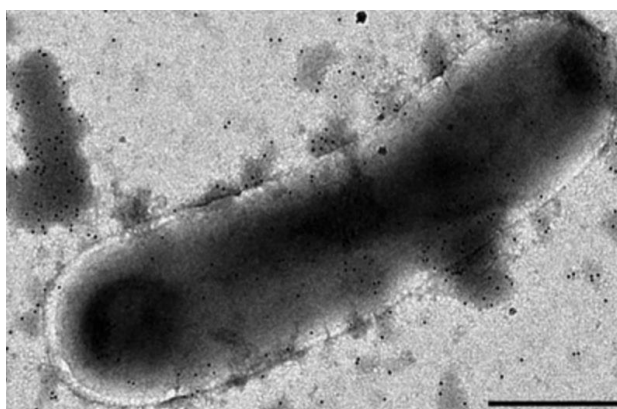
Considerando que o Brasil permanece entre os 30 países com maior carga de TB e coinfeção TB/HIV, e que a pandemia de COVID-19 prejudicou a busca ativa de casos de TB-DR, favorecendo a transmissão de cepas resistentes, fica evidente que os objetivos da WHO estão longe de serem atingidos. Os resultados insatisfatórios no controle da TB, tanto global quanto regionalmente, mostram a necessidade de um maior comprometimento para acabar com a epidemia mundial de TB (Brasil, 2024; WHO, 2023).

2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

2.2.1 Características gerais

Pertencente ao filo Actinobacteria e à família Mycobacteriaceae, o gênero *Mycobacterium* inclui pequenos bacilos em forma de bastão, que podem ser retos ou ligeiramente curvos, e cuja dimensão varia de acordo com a espécie, entre 1 e 10 μm de comprimento e 0,2 a 0,6 μm de largura (Figura 3). São imóveis, aeróbios estritos e intracelulares facultativos. Reproduzem-se assexuadamente por divisão binária e, em condições ideais (37°C), seu número dobra rapidamente. Esses bacilos não esporulam nem formam cápsulas (Somoskovi; Salfinger, 2014; Gordon; Parish, 2018).

Figura 3 - Eletromicrografia da célula do *M. tuberculosis*.

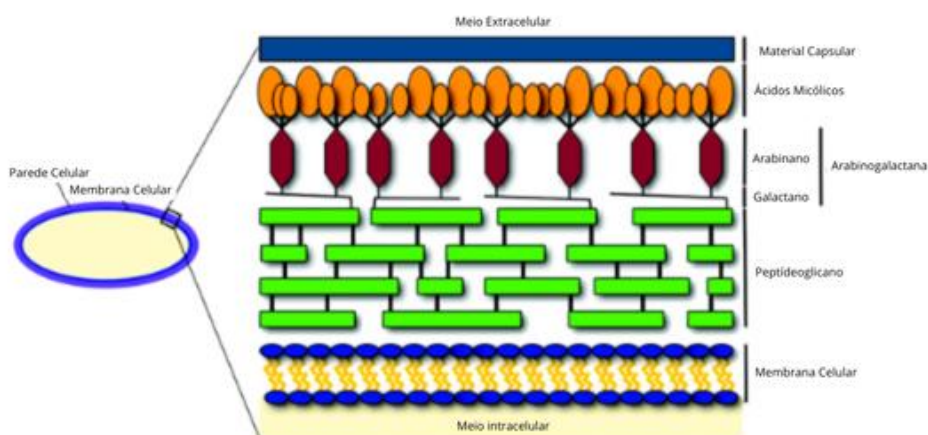


Fonte: Adaptado de KALSCHAUER et al., 2019

O *Mycobacterium spp.* compreende mais de mil espécies de acordo com a comparação entre as sequências de RNA ribossômico (rRNA) da subunidade 16s (Tortoli, 2006). O gênero tem como principal característica a presença de ácidos micólicos no envelope bacteriano (Figura 3), o que confere uma diferenciação entre as espécies, possibilitando assim que sejam identificadas através da coloração de Ziehl-Nielsen, específica para bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR). Estruturas lipídicas e polissacarídicas são responsáveis por conferir estas características ao envelope (Campos, 2006; Octora; Kawilarang; Endraswari, 2022).

A composição química singular do envelope forma camadas de peptidoglicano e arabinogalactano que estabelecem um complexo macromolecular, covalentemente ligado a uma típica membrana plasmática. Este complexo, por sua vez, está ligado de forma não-covalente aos ácidos micólicos (Figura 4). Todo esse aparelho confere uma impermeabilidade aos bacilos até 100 vezes menor que o *P. aeruginosa*, outro bacilo impermeável, justificando a capacidade de resistir a medicamentos e a situações adversas de ressecamento (Trias; Benz, 1994; Forbes et al., 2018; Kalscheuer et al., 2019). Acrescenta-se a esta propriedade, a dificuldade de transpor nutrientes através desta barreira, o que justifica o crescimento lento, levando semanas para que se possa observar as primeiras colônias bacterianas em meio de cultura específico para micobactérias (Tortora et al., 2017).

Figura 4 - Diagrama dos componentes básicos da parede celular micobacteriana.



Fonte: Adaptado de Hett; Rubin, 2018.

Sendo um dos primeiros microrganismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* a serem identificados, juntamente com o *M. leprae*, o *M. tuberculosis* é um parasita intracelular, que possui tropismo pelas células macrofágicas, e utiliza esse tipo celular para se reproduzir. Uma vez que ocorra a proliferação no macrófago, os bacilos são liberados no ambiente alveolar a depender do comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro para sua eliminação, uma vez que este é capaz de suprimir a infecção micobacteriana quando em estado saudável (Cruz-Knight et al., 2013; Forbes et al., 2018).

No tocante à bioquímica, o *M. tuberculosis* se apresenta positivo para o teste de niacina e é capaz de reduzir nitrato a nitrito, sendo estes os principais testes para diferenciá-lo de outras bactérias. Contudo, testes moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) e o Teste Rápido Molecular (TRM) Xpert MTB/RIF são mais utilizados para diferenciação de outras micobactérias, através da avaliação genética de loci específicos (Cook et al., 2009; Gordon; Parish, 2018).

2.2.2 Transmissão

O bacilo da TB é transmitido principalmente de pessoa para pessoa por meio de partículas aerossolizadas (Shiloh, 2016). Um passo crucial na propagação da infecção é a liberação dos bacilos no ar, mantendo-os viáveis durante o trânsito aéreo. Embora a tosse seja a principal forma de transmissão, outros meios, como fala, respiração e outras manobras respiratórias, também podem contribuir para a propagação da infecção entre humanos (Turner; Bothamley, 2014; Coleman et al., 2022).

As partículas infecciosas do MTB em pacientes infectados têm tamanho médio de 5 a 7 μm e permanecem no ar, contaminando especialmente ambientes mal ventilados. Conhecidas como gotículas de Flügee, elas evaporam e formam um núcleo infeccioso com o MTB, que pode ser inalado por indivíduos saudáveis, iniciando assim a infecção e a patogenia da doença (Sá et al., 2007; Alves; Prado; Takanemi, 2022; Coleman et al., 2022).

A série de eventos que caracterizam a transmissão da TB segue uma ordem que começa por um paciente infectado, seguido pela geração de aerossóis contendo o bacilo. Aqueles que sobreviverem no ambiente poderão ser inalados por um indivíduo suscetível à infecção, gerando assim o potencial de desenvolver a doença (Churchyard et al., 2017). A carga infecciosa e a gravidade da doença dependem tanto do hospedeiro quanto do MTB. Variáveis como idade, sexo, competência imunológica, comorbidades, vacinação, sintomatologia do hospedeiro, vigor da tosse e estilo de vida são fatores a serem considerados (Mathema et al., 2017; Coleman et al., 2022).

Alguns estudos levantam fatores determinantes, como exemplo: o paciente com TB resistente tende a ter uma carga bacilífera em quantidade consideravelmente maior do que um caso de TB sensível ao tratamento padrão (THERON et al., 2020). Outros dados de uma recente pesquisa de prevalência revelaram que em países com alta incidência de TB – tal como o Brasil – entre 36,1% e 79,9% dos casos confirmados através de exame bacteriológico foram advindos de indivíduos que não apresentaram tosse crônica ou outro sintoma característico. Isso evidencia a necessidade de maiores estudos neste campo em prol do controle da transmissão da patologia (Frascella et al., 2020).

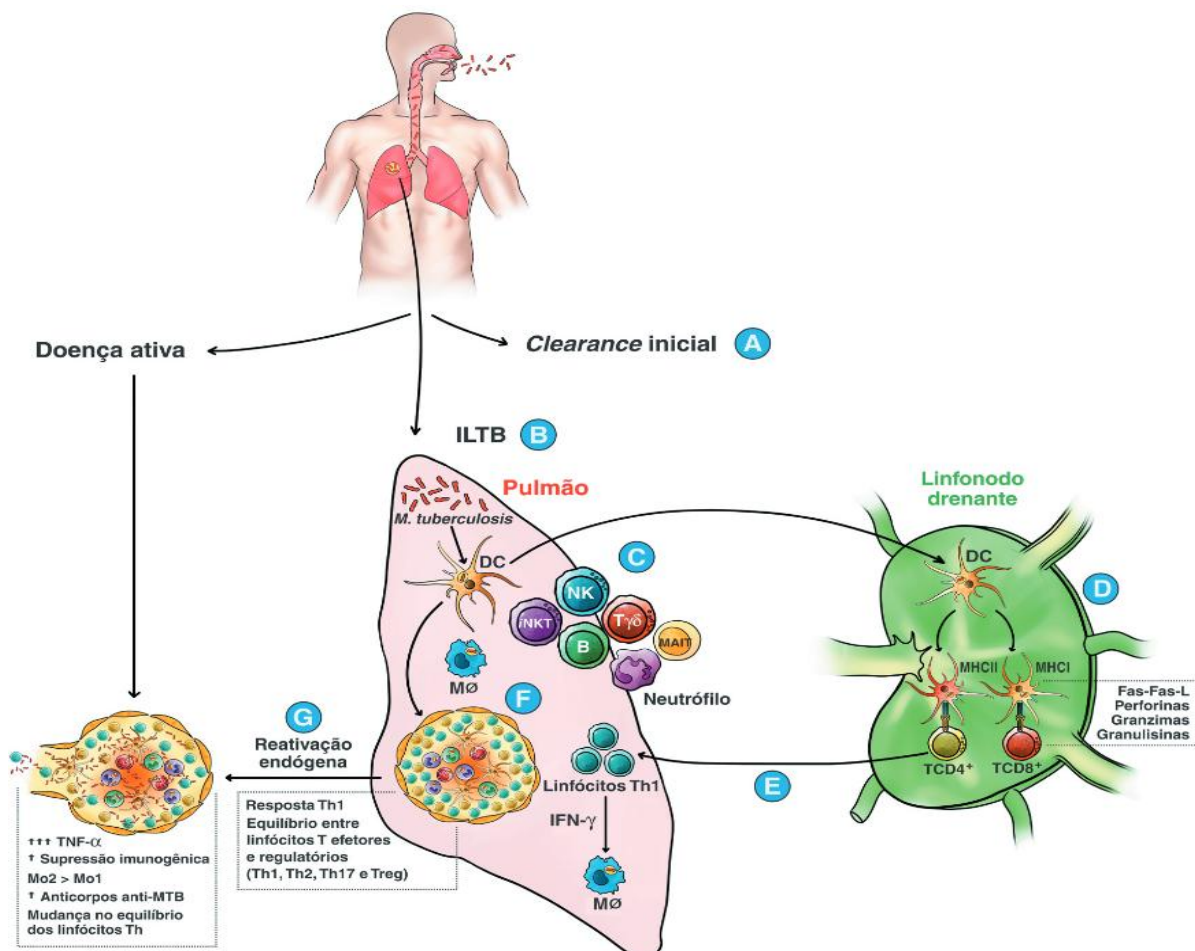
2.2.3 Imunopatologia e fisiopatologia

O processo fisiopatológico da tuberculose (TB) envolve uma complexa interação entre as respostas imunes do hospedeiro e os mecanismos de sobrevivência do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), que ao longo dos anos desenvolveu uma relação simbiótica com o sistema imunológico humano, coevoluindo com ele (Chai et al., 2020; Maison, 2022). A virulência da TB inicia-se com a captura do bacilo nas vias aéreas superiores, mediada pela ação do muco e dos cílios (Ryndak; Laal, 2019).

Após ultrapassar essa barreira, o MTB atinge a porção distal do pulmão, estabelecendo-se nos espaços alveolares. O bacilo então invade além da mucosa e do epitélio alveolar, infectando células epiteliais e células especializadas da mucosa nasal e brônquica, alcançando os alvéolos (Knechel, 2009; Kathryn et al., 2022). Os macrófagos alveolares são os próximos alvos, recrutados por diversos mecanismos e agentes, como linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e o Fator de Necrose Tumoral- α (do inglês, *Tumoral Necrosis Factor α* -- TNF- α) (Bozzano; Marras; De Maria, 2014).

A TB pode evoluir de três maneiras: eliminação total do bacilo pela imunidade inata, resultando em cura; eliminação parcial, resultando em infecção latente (ILTb) onde os bacilos permanecem em granulomas; ou desenvolvimento da forma ativa e sintomática da doença (Figura 5) (Campos, 2006; Bozzano; Marras; De Maria, 2014).

Figura 5 - Representação esquemática dos aspectos imunológicos associados à infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e seus desfechos.



Legenda: B = linfócitos B, DC = células dendríticas, ILTB = infecção latente da tuberculose, iNKT = células T natural killer invariantes, MAIT = células T invariantes de mucosa, MHCI = complexo principal de histocompatibilidade classe I, MHCII = complexo principal de histocompatibilidade classe II, MØ = macrófagos, NK = natural killer, T = linfócitos T.

Fonte: Alves, Prado, Takanemi, 2022

A imunidade inata é fundamental na proteção do indivíduo, permitindo que a maioria das pessoas expostas ao bacilo controle a infecção por meio da imunidade inata e/ou adaptativa (Ernst, 2012). Nos estágios iniciais da infecção, o bacilo da TB se replica por divisão celular assimétrica, aproveitando os recursos do ambiente intracelular dos macrófagos alveolares (Maison, 2022). O MTB manipula várias vias reguladoras imunes, tanto do sistema inato quanto do adaptativo, incluindo a maquinaria regulatória nuclear, moléculas co-estimulatórias, o sistema de ubiquitina e componentes imunes celulares intrínsecos, o que pode resultar na falha da resposta imune inata (Huang et al., 2020).

O MTB é inicialmente reconhecido por receptores de reconhecimento padrão, como os Toll-like receptors, que ativam vias pró-inflamatórias envolvendo fatores como NF- κ B. O MTB é inicialmente reconhecido por receptores de reconhecimento padrão, como os Toll-like receptors, que ativam vias pró-inflamatórias envolvendo fatores como NF- κ B. Outros receptores, como NLR, lectinas e receptores scavengers, também participam do reconhecimento do bacilo (Alves; Prado; Takenami, 2022).

Após a detecção, macrófagos e células dendríticas fagocitam o bacilo, embora cepas virulentas possam escapar da destruição intracelular. A produção de citocinas pró-inflamatórias recruta e ativa leucócitos para combater a infecção. Células não convencionais, como células MAIT, iNKT, linfócitos $\gamma\delta$ e células T CD1 restritas, desempenham papéis importantes na defesa contra o MTB, respondendo rapidamente à infecção, embora esses mecanismos possam falhar devido às estratégias de escape do bacilo (Figura 5) (Alves; Prado; Takenami, 2022).

Os macrófagos e outras células imunes infectadas pelo MTB se agregam, formando o microambiente do granuloma, ou tuberculoma, promovendo interações entre as células (ERNST, 2012). Este microambiente é mediado por moléculas como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês *Tumoral Necrosis Factor alpha* -- TNF- α), Vitamina D, Interferon- γ , e outros mediadores químicos (Heemskerk et al., 2015).

Em pacientes imunossuprimidos como portadores de artrite reumatoide, que usualmente fazem o uso de medicações que inibem moléculas inflamatórias como o TNF- α , o controle da doença é prejudicado, uma vez que há menor ativação imunológica de linfócitos e outros componentes da resposta imune (Alves; Prado; Takenami, 2022).

Esta premissa também se aplica para pessoas vivendo com o HIV/AIDS (PVHA), com contagem de linfócitos T CD4⁺ inferior à 350 células/mm³, pois o risco de reativação da ILTB é considerado alto. O HIV tem tropismo por linfócitos T CD4⁺, comprometendo a imunidade celular e a estrutura do granuloma. A coinfeção TB/HIV não apenas favorece a reativação da tuberculose latente e o desenvolvimento da doença ativa, mas também aumenta a mortalidade e letalidade da TB. Isso reforça a importância da testagem oportuna para HIV em pacientes com TB e vice-versa, principalmente em países como o Brasil, onde estes casos são comuns (Alves; Prado; Takenami, 2022; Brasil, 2024).

O granuloma apresenta uma organização característica, com um centro composto por células fagocitárias da imunidade inata, predominantemente macrófagos, e uma região cortical predominada por células da imunidade adquirida, principalmente linfócitos T (Ramakrishnan, 2012). No centro desse microambiente, os bacilos do MTB se situam, representando o principal local de reprodução do patógeno. Nesse contexto, o sistema imune é mais uma vez mobilizado na tentativa de controlar a infecção por meio do recrutamento de mais células para o local da infecção (Marakalala et al., 2016).

Com o tempo, o granuloma torna-se estável culminando na infecção latente por tuberculose (ILTb) a qual é definida pela sensibilização imunológica, evidenciada por reações cutâneas positivas após exposição ao PPD ou por produção de IFN- γ em testes como o IGRA. Neste cenário, o granuloma torna-se estável, com áreas de fibrose ou calcificação, controlando a infecção, mas os bacilos podem permanecer viáveis por muitos anos (Alves; Prado; Takenami, 2022).

Embora o granuloma seja um mecanismo de defesa natural, ele pode levar a manifestações clínicas, como cavitação pulmonar e formação de granuloma caseoso, observadas em pacientes com TB ativa (Chandra; Grigsby; Philips, 2022). A falha das respostas imunes no controle do patógeno, juntamente com os mecanismos de evasão do MTB, a inflamação devido à ativação imunológica, e fatores do paciente, como diabetes e coinfeção com HIV, podem levar ao surgimento das manifestações clínicas, perpetuando o ciclo de contaminação da doença (Kanabalan et al., 2021).

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da TB é realizado pela análise dos critérios clínico-epidemiológicos do paciente associados a diversos métodos, os quais são selecionados com base na condição clínica do paciente e correspondentes aos seus sinais e sintomas. Métodos como cultura, baciloscopia, exames de imagem e histopatológicos, e os testes moleculares e imunológicos desempenham um papel fundamental na detecção da infecção, além de fornecerem informações sobre a previsibilidade da resistência bacteriana (Natarajan et al., 2020; Gill et al., 2022).

Por décadas, o padrão-ouro para a detecção do MTB tem sido a abordagem laboratorial convencional envolvendo a caracterização fenotípica das colônias bacterianas crescidas em meio de cultura Lowenstein-Jensen (LJ). No entanto, a recomendação atual da WHO é a combinação de um método fenotípico com um molecular capaz da detecção rápida da presença do MTB (Natarajan et al., 2020; WHO, 2023).

Em busca de estabelecer um diagnóstico mais preciso, tem se observado a necessidade de métodos diagnósticos baseados em novas tecnologias, como é o caso dos testes de amplificação de ácido nucleico (Suárez et al., 2019). A implementação destas tecnologias demonstrou significativa evolução no tocante à qualidade de tratamento e terapia efetiva (Gill et al., 2022).

Estes testes são caracterizados pela sua rapidez, e elevadas sensibilidade e especificidade, como o Gene Xpert (MTB/RIF ou MTB/RIF Ultra) ou Teste Rápido Molecular para Tuberculose (TRM-TB), uma metodologia baseada em PCR multiplex associada ao *nested* em tempo real. A estratégia é recomendada pela WHO como teste de triagem para detecção da TB pulmonar e extrapulmonar (Jang; Chung, 2020; WHO 2023).

Melhorar a eficiência e a precisão do diagnóstico da TB contribui diretamente para a eficácia do tratamento, desde que promova a plena identificação da infecção e reconhecimento de resistência (Suárez et al., 2019). Estes fatores contribuirão para melhor aderência dos pacientes ao tratamento, medidas profiláticas efetivas, e triagem precisa do quadro do indivíduo (Gill et al., 2022).

Embora os métodos fenotípicos tradicionais ainda desempenhem um papel crucial na detecção do MTB, existem lacunas a serem preenchidas, como a baixa sensibilidade na baciloscopia e na radiografia e o atraso no diagnóstico devido os longos períodos de crescimento micobacteriano em cultura e nos testes de susceptibilidade a fármacos *in vitro* (Acharya et al., 2020). Isso tem resultado em maiores dificuldades no tratamento da TB sensível e droga resistente (Gröschel et al., 2021).

A WHO recentemente endossou alguns métodos diagnósticos inovadores baseados em testes moleculares, ensaios clínicos, e técnicas automatizadas, focando na rápida e precisa detecção da infecção e resistência (Acharya et al., 2020; WHO, 2023); Alguns exemplos incluem: microscopia com luz emitida por diodo (LED), o sistema BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960, o ensaio de lipoarabinomanana urinária de fluxo lateral, a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) e o teste de hibridização de sonda de linha (do inglês, *Line Probe Assay* – LPA). A microscopia de esfregaço de escarro e a microscopia com LED-fluorescência, sendo os métodos para uso em laboratórios com pouca estrutura (Shivakumar; Shettigar, 2023).

Embora muitas outras metodologias estejam em fases de testes junto a órgãos de saúde pública mundiais e regionais, têm se observado que o futuro do diagnóstico da TB esteja direcionado para o sequenciamento de genoma completo (do inglês, *Whole-Genome Sequencing* – WGS) (Pai; Dewan; Swaminathan, 2023). Esta tecnologia de diagnóstico é capaz de suprir diversas lacunas encontradas hoje no diagnóstico da TB, envolvendo detecção precisa e resistência que serão exploradas mais a frente neste trabalho (Meehan et al., 2019).

2.2.5 Tratamento

O tratamento da TB tem como principal objetivo a cura e rápida redução da transmissão da doença. Para isso, é fundamental que os fármacos utilizados sejam capazes de reduzir a população bacilar, prevenir o surgimento de cepas resistentes, e eliminar o foco da infecção (Sotgiu et al., 2016; Rabahi et al., 2017). Estudos da história natural da TB, na ausência de fármacos anti-TB (conduzidas antes da introdução da primeira terapia medicamentosa), descobriram que em torno de 70% dos indivíduos com baciloscopia positiva, vieram a óbito em até 10 anos, assim como 20% dos pacientes com cultura positiva, e baciloscopia negativa (Tiemersma et al, 2011; WHO 2023).

Desde sua descoberta e introdução em 1946, a estreptomicina, um antibiótico derivado da *Streptomyces griseus*, desempenhou um papel crucial na revolução do tratamento da TB (Schatz; Bugle; Waksman 1944; Wassersug, 1946). Esse avanço inicial representou o ponto de partida para uma jornada contínua de desenvolvimento que culminou na formulação das atuais terapias empregadas no tratamento da TB (Hoagland et al., 2016; (Dartois; Rubin, 2022).

No contexto brasileiro, a terapia antituberculose foi introduzida já na década de 1940, com a utilização da SM em combinação com o ácido para-aminossalicílico (BRASIL, 2011). No entanto, devido ao surgimento de casos de resistência bacteriana e com o objetivo de minimizar os efeitos colaterais e a mortalidade associada à doença, a estratégia terapêutica passou por diversos avanços ao longo do tempo (Rabahi et al., 2017).

2.2.5.1 Tratamento da TB sensível a medicamentos

Atualmente, a recomendação da WHO preconiza um regime de 6 meses com INH, RIF, EMB e PZA, no esquema 2RHZE/4RH. Nos primeiros dois meses para pacientes com TB sensível ao tratamento de primeira linha recomenda-se o uso combinado de RHZE, seguido de RH pelos quatro meses subsequentes (Tabela 1) (WHO, 2023).

Com relação ao do tratamento da ILTB, desde o ano de 2021, recomenda-se o esquema 3HP, que consiste em doses semanais, com duração de 12 semanas, de rifapentina (P), associada à H. Essa estratégia visa diminuir o risco da infecção para TB ativa e tem uma menor quantidade de doses, diminuindo os efeitos adversos e aumentando a adesão terapêutica (Brasil, 2024).

Embora a TB seja tratável e com sucesso se alcance a cura, existem desafios no tratamento devido à necessidade de esquemas terapêuticos prolongados, uma vez que se estendem por 6 meses ou mais. Devido à fase intensiva do tratamento, que contém doses altas de medicações diárias, surgem muitos efeitos adversos, e isso leva ao abandono do tratamento. Muitas vezes abandonado ainda no início, o tratamento torna-se então inefetivo, e, conseqüentemente diversos casos de resistência surgem (Hoagland et al., 2016; WHO, 2023).

Tabela 1 - Esquema Básico para o tratamento da TB em adultos e adolescentes (≥ 10 anos de idade): 2RHZE/4RH.

Esquema	Faixas de Peso	Unidade/Dose	Duração
RHZE			
150/75/400/275mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	20 a 35 Kg	2 comprimidos	2 meses (fase intensiva)
	36 a 50 Kg	3 comprimidos	
	51 a 70 Kg	4 comprimidos	
	Acima de 70 Kg	5 comprimidos	
RH			
300/150 mg ou 150/75 mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	20 a 35 Kg	1 comp 300/150 mg ou 2 comp 150/75 mg	4 meses (fase de manutenção)
	36 a 50 Kg	1 comp 300/150 mg + 1 comp de 150/75 mg ou 3 comp 150/75 mg	
	51 a 70 Kg	2 comp 300/150 mg ou 4 comp 150/75 mg	
	Acima de 70 Kg	2 comp 300/150 mg + 1 comp de 150/75 mg ou 5 comp 150/75 mg	

Legenda: RHZE: Rifampicina/Isoniazida/Pirazinamida/Etambutol; RH: Rifampicina/Isoniazida
 Fonte: Adaptado de WHO, 2023.

2.2.5.2 Tratamento da TB resistente a medicamentos

Para o tratamento da tuberculose resistente, são necessários medicamentos de segunda linha, incluindo medicamentos injetáveis (Tabela 2) (Gupta; Ish; Malhotra, 2021). Esse cenário torna o tratamento mais longo, com duração de 18 a 20 meses, além de mais custoso e associado a uma maior incidência de efeitos adversos, sendo 45% deles classificados como moderados a graves (WHO, 2023). No Brasil, o índice de insucesso no tratamento da tuberculose resistente foi de 47,2% em 2020, destacando-se pelas altas taxas de abandono (Brasil, 2024).

Tabela 2 - Medicamentos de segunda linha para o tratamento da TB-DR.

Classe dos medicamentos	Medicamentos anti-TB
Fluoroquinolonas	Levofloxacino, moxifloxacino e gatifloxacino
Aminoglicosídeos	Amicacina, capreomicina, canamicina e estreptomicina
Outros agentes de segunda linha	Etionamida/protionamida, cicloserina/terizidona, linezolida e clofazimina
Agentes adicionais	Bedaquilina, delamanida, ácido para-aminossalicílico, imipenem-cilastatina, meropenem, amoxicilina-clavulanato, claritromicina, tiocetona e pretonamida

Fonte: Adaptado de MASSABNI; BONINI, 2019.

Cinco categorias são utilizadas pela WHO para classificar os casos de TB resistente a medicamentos: tuberculose resistente à um medicamento que não seja a RIF (TB monorresistente); tuberculose resistente à RIF (TB-RR); tuberculose multidroga resistente (TB-MDR) que se trata da união dos dois casos; tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR); e TB pré-XDR. A TB pré-XDR é aquela que é resistente à RIF, INH a qualquer fluoroquinolona (uma classe de medicamentos anti-TB de segunda linha). Já a TB-XDR é resistente à RIF, isoniazida, e um das fluoroquinolonas (FQs), e pelo menos um dos novos medicamentos: bedaquilina ou linezolida (WHO, 2023).

Para enfrentar essa questão, estão sendo desenvolvidas novas combinações de fármacos e terapias inovadoras. Isso inclui a implementação de novos esquemas terapêuticos menos onerosos, visando aumentar a efetividade do tratamento tanto em casos de sensibilidade quanto de resistência micobacteriana (Ferraz-Carvalho, 2016; Rabahi et al., 2017; Dartois e Rubin, 2022). Além disso, há uma urgência na implementação de métodos diagnósticos rápidos e confiáveis do tipo point-of-care (POC) para uma gestão eficaz dos casos (Acharya et al., 2020).

As últimas diretrizes da WHO priorizam um novo tratamento para a TB-RR e TB-MDR (WHO, 2022). Um novo regime de 6 meses, chamado BPaLM (composto por: bedaquilina, pretomanida, linezolida e moxifloxacina), é priorizado e recomendado para pessoas com 14 anos ou mais. Para os casos de TB pré-XDR, o regime BPaL, sem a moxifloxacina, pode ser utilizado. As taxas de sucesso do tratamento TB-RR variam entre 50-75% globalmente, com uma média recente de 63%. O regime BPaLM mostrou uma taxa de sucesso de 89% em ensaios clínicos. No entanto, o tratamento para TB XDR continua sendo muito mais difícil, com taxas de sucesso geralmente baixas (WHO, 2022; WHO, 2023).

Isso se dá majoritariamente pelo fato de que os perfis de resistência podem variar entre e ou até mesmo dentro dos países, fazendo com que tratamentos padronizados, principalmente para os casos de resistência podem não ser tão efetivos em alguns casos (He et al., 2020). Uma das grandes razões para os testes fenotípicos se basearem na metodologia de cultura bacteriana, a qual é lenta e pode dificultar a terapêutica do paciente (Cabibbe et. Al., 2018; Meehan et al., 2019).

Nestes casos, testes de sensibilidade à drogas com ampla cobertura se fazem necessários, como a abordagem baseada em WGS que é capaz de prever a resistência à drogas através da identificação de mutações de resistência que podem ou não ter sido expressas fenotipicamente (Cabibbe et. Al., 2018; Meehan et al., 2019). Embora esta associação entre o WGS e o tratamento final ainda esteja em debate (He et al., 2020).

2.2.6 Genoma

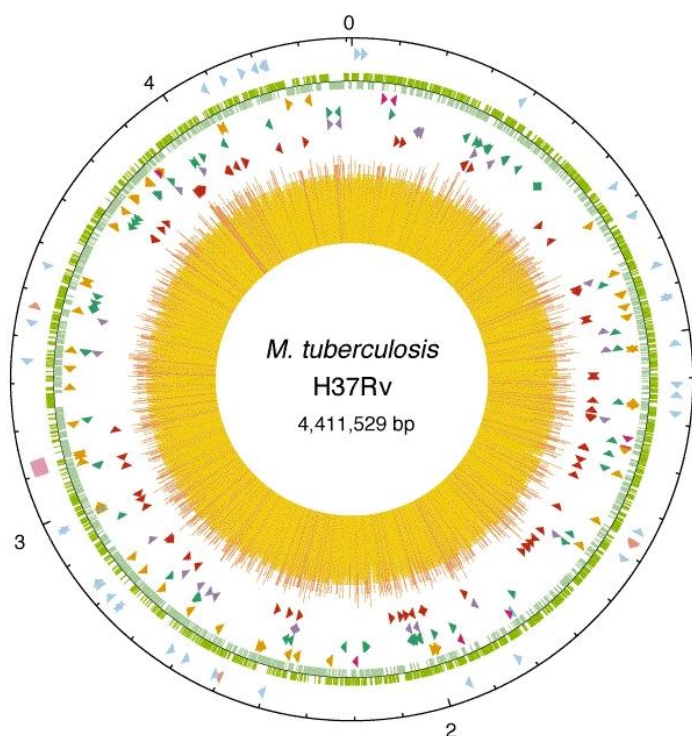
A cepa *M. tuberculosis* H37Rv, que atualmente é considerada a cepa virulenta de referência em estudos relacionados à TB, foi sequenciada pela primeira vez em 1998 (Cole et al., 1998). O sequenciamento completo de seu genoma revelou-se um marco fundamental no avanço do combate à TB desde sua descoberta, devido às vantagens que apresenta, como a manutenção da virulência em modelos animais e a facilidade de manipulação genética (Chitale et al., 2022).

Ao longo do tempo, esse avanço tem impactado positivamente diversas áreas, incluindo taxonomia, desenvolvimento de tratamentos farmacêuticos, mecanismos de resistência bacteriana, epidemiologia, desenvolvimento de vacinas e patogênese (Meehan et al., 2019; Comín et al., 2022; Liang et al., 2023). Desde então, a compreensão do genoma desta cepa tem sido crucial para o progresso contínuo na luta contra a TB, exercendo uma influência positiva no campo da saúde pública e da pesquisa biomédica (Koleske; Jacobs; Bishai, 2023).

Primordialmente, o primeiro estudo genômico da H37Rv revelou um genoma com 4.411.529 pares de bases (pb) (Cole et al., 1998) e um único cromossomo (Figura 6), sendo 65,6% composto de sequências GC, mostrando-se adequado para a análise de WGS (Coll et al., 2014; Dantas; Frota, 2014; Cohen, et al., 2019).

Contudo, estudos recentes trouxeram atualizações quanto à estrutura genômica da cepa H37Rv, contabilizando o total de 4.417.942 pb, aproximadamente 4000 genes, 109 polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide polymorphisms* – SNPs) e 35 pequenas sequências de inserções e deleções (indels), utilizando uma esteira de metodologias genômicas e bioinformática (Chitale et al., 2022).

Figura 6 – Mapa do cromossomo circular do *M. tuberculosis* H37Rv.



Fonte: Coll et al., 1998

O genoma do MTB apresenta baixa variedade genética, em parte devido a sequências repetitivas inseridas. Estudos indicam uma variação média de 6 nucleotídeos em 100 amostras analisadas (Walker et al., 2013; Koleske; Jacobs; Bishai, 2023). Essa baixa variabilidade pode levar à identificação incorreta de SNPs em algumas anotações, dificultando o prognóstico de reincidências, reinfecções e podendo resultar em diagnósticos falsos (Meehan et al., 2019).

A heterogeneidade sutil entre sequências genômicas, aliada a métodos de diagnóstico como o WGS, proporcionou uma visão mais precisa em aspectos como diagnóstico e identificação de SNPs relacionados a mutações de resistência (Cohen et al., 2019). No entanto, a limitação da análise genômica a sequências consensuais, como o alvo IS6110 polifilético – uma sequência de inserção transposônica com cerca de 25 cópias presente no genoma de micobactérias – tem restringido o entendimento genético e, por consequência, muitos outros aspectos da evolução do MTB (Mcevoy et al., 2007; Morales-Arce, 2020; Koleske; Jacobs; Bishai, 2023).

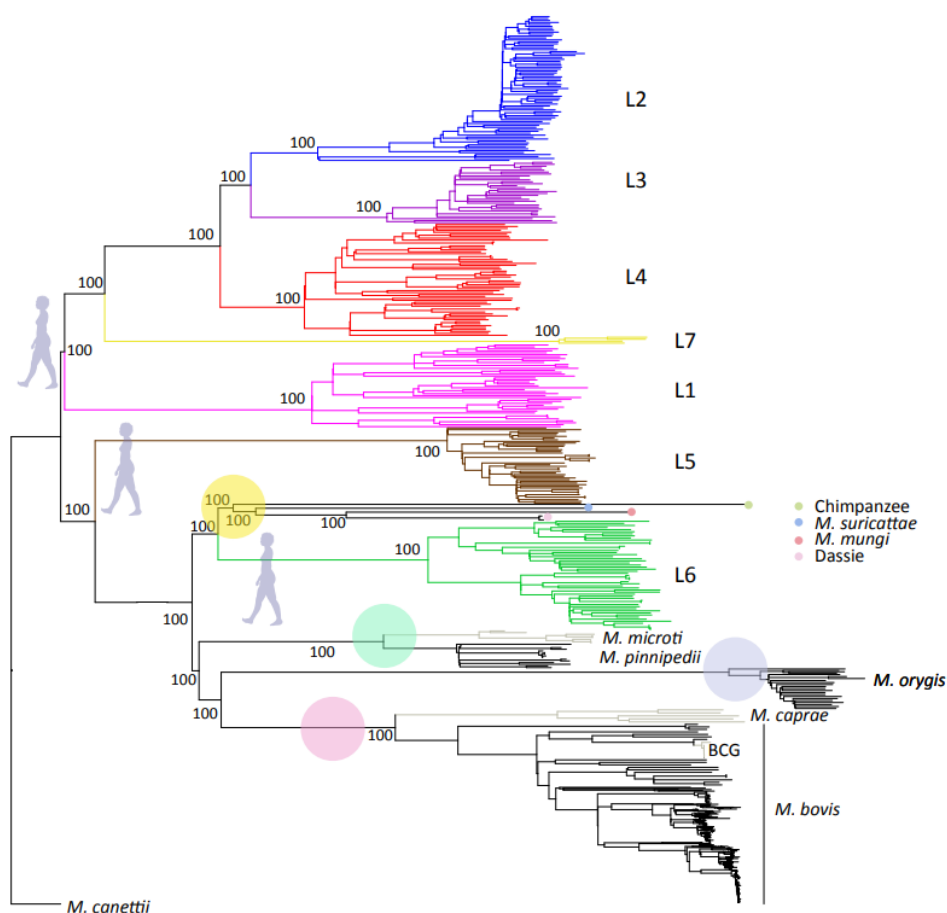
2.2.7 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Convencionalmente, a TB é causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), o qual se trata de uma seleção composta por nove espécies de bacilos álcool-ácido resistentes que possuem uma relação próxima filogeneticamente. Esta relação compreende (Brites; Gagneux, 2017). Evolutivamente, algumas espécies se adaptaram ao ser humano, e diversas outras se adaptaram a outros animais, como o *M. bovis* (gado bovino), *M. caprae* (cabras domésticas), o *M. pinnipedii* (focas e leões marinhos) e o *M. orygis* (antílopes) (Brites et al., 2018).

Dentre as espécies do CMTB as, adaptadas ao ser humano são divididas entre as linhagens L1 até L7, sendo 5 principais geralmente referidas como *Mycobacterium tuberculosis* stricto sensu (L1-L4 e L7), e duas linhagens conhecidas como *Mycobacterium africanum* (L5 e L6), sendo esta última potencialmente menos patogênica (Figura 7) (De Jong; Antonio; Gagneux, 2010; Brites; Gagneux, 2017).

O CMTB apresenta, além de uma diversidade genética, uma variação geográfica entre as linhagens. A Linhagem 2 (Leste Asiática – Genótipo Beijing) e a Linhagem 4 (Euro Americana) estão distribuídas em todos os continentes, enquanto as demais linhagens, como a Linhagem 5 (*M. africanum* Leste da África 1), a Linhagem 6 (*M. africanum* – Leste da África 2), a Linhagem 7 (Etíope); a Linhagem 1 (Indo-Oceânica) e a Linhagem 3 (Centro-Asiática), apresentam uma restrição geográfica mais pronunciada. (Gagneux; Brites, 2017). É interessante notar que a presença de linhagens exclusivamente encontradas na África, fazem com que este continente seja o único a abrigar todas as linhagens adaptadas ao humano de MTB (Noorizhab et al., 2023).

Figura 7 - Árvore filogenética com máxima verossimilhança e distribuição das linhagens.



Legenda: L1-L7: Linhagens 1-7 do CMTB.

Fonte: Adaptado de Brites et al., 2018.

Enquanto outras linhagens do CMTB adaptado ao ser humano encontram-se majoritariamente isoladas em regiões específicas, a linhagem 4 existe em alta frequência em todos os continentes. Embora as razões ainda não sejam claras, a linhagem 4 apresenta alta virulência em modelos de infecção animal (Gagneux; Brites, 2017).

De acordo com a Stuck e colaboradores (2016), esta linhagem pode se dividir entre 10 sublinhagens, sendo elas L4.1.1, L4.1.3, L4.1.2, L4.2, L4.3, L4.4 L4.5, L4.6.1 e L4.6.2 e L4.10. O estudo também menciona que na análise filogeográfica, a linhagem 4.3 era a mais frequente em todo o globo (20,3%). Já a linhagem 4.1.1 era muito frequente na região das Américas, embora esteja entre as 4 mais frequentes.

O complexo é considerado monomórfico geneticamente, com 99% similar, quanto ao seu genoma caracterizado com alta capacidade clonal, não transferindo seus genes horizontalmente, sendo diferenciados majoritariamente pelas suas diferenças genéticas em larga escala, chamadas de regiões de diferenças (RDs) (Brites; Gagneux, 2017; Sanoussi et al., 2021). A região TbD1 (M. tuberculosis deleted region 1), é um exemplo, pois através dela classificam-se as linhagens entre “ancestrais” e “modernas”, embora o tempo evolucionário não seja levado em consideração (Smith et al., 2009).

2.2.8 Diversidade Genética do CMTB

Antes do advento progressivo de técnicas como o sequenciamento de nova geração (do inglês, *New Generation Sequencing* – NGS), as espécies do CMTB eram diferenciadas majoritariamente através de estudos epidemiológicos e morfológicos, utilizando-se de diferentes tipos de RD altamente repetitivas e polimórficas como principais marcadores para identificação e diferenciação das espécies (Niemann et al., 2016).

Atualmente, as tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) representam um avanço significativo na pesquisa micobacteriana. Essas tecnologias permitem a correlação de dados genômicos, possibilitando a identificação de características particulares e relevantes (Meehan et al., 2019).

Por exemplo, a análise comparativa de genomas completos (WGS) entre diferentes espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) revelou diferenças genéticas notáveis entre linhagens que infectam humanos e aquelas que infectam outros animais. A maior diferença encontrada foi de até 2.7% do genoma total (comparando qualquer cepa do CMTB clássico e a *M. canettii*), excluindo sequências repetitivas, entre espécies adaptadas a humanos e outros animais. Já entre as cepas adaptadas exclusivamente ao ser humano, a maior diferença foi de até 1800 SNPs, correspondendo à comparação entre a L7 e as qualquer uma das linhagens 1,5 ou 6 (Coscolla; Gagneux, 2014).

A diversidade genética do CMTB está intrinsecamente relacionada a diversos estudos voltados para a investigação da resistência bacteriana (Niemann et al., 2016). Além dos SNPs, há outras fontes de diversidade genética. Elementos repetitivos e móveis presentes nos genomas das espécies do CMTB podem ser classificados como: Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Inter Espaçadas (CRISPR), Número Variável de Repetições em Tandem (VNTR) e Sequências de Inserção (IS). Todos esses três elementos são polimórficos e têm sido usados para tipagem e classificação das cepas (Coscolla, 2017).

Esse interesse crescente é impulsionado pelo surgimento de novas tecnologias de diagnóstico, que fornecem informações cada vez mais precisas (Niemann et al., 2016). Tais tecnologias capacitam a diferenciação de padrões de espécies, genótipos, transmissão e, especialmente, resistência bacteriana (Cohen et al., 2019). Além disso, elas permitem a identificação de associações moleculares derivadas de regiões variáveis do genoma, as quais, entre outros aspectos, elucidem mutações responsáveis por diferentes padrões de resistência (Köser et al., 2012; Vázquez-Chacón et al., 2022; Noorizhab et al., 2023).

2.2.9 Tuberculose Droga Resistente (TB-DR)

Nos microrganismos, os genes podem ser herdados ou adquiridos de plasmídeos. Essa transferência horizontal de genes pode facilitar a propagação da resistência a antibióticos entre diferentes cepas bacterianas. Além disso, a resistência também pode surgir de forma espontânea, através de mutações genéticas esporádicas a cada replicação. Quando os antibióticos eliminam as bactérias sensíveis, as resistentes são deixadas para proliferar devido à pressão seletiva exercida pelo ambiente (Massabni; Bonini, 2019).

Microrganismos, incluindo do CMTB, empregam vários mecanismos para resistir a medicamentos antimicrobianos, como enzimas de modificação de medicamentos, prevenção da entrada de medicamentos, sistemas de efluxo de medicamentos hiperativos e mutações que alteram os alvos dos medicamentos (Singh; Gupta; Singh, 2020).

A resistência do MTB às drogas é resultado de mutações cromossômicas espontâneas e aleatórias, que levam à redução da susceptibilidade a tratamentos específicos (Jang; Chung, 2020). Essas alterações podem ser causadas por vários fatores, incluindo regimes de tratamento inadequados, efeitos colaterais que resultam em má adesão do paciente ao tratamento, má absorção dos fármacos e interações entre eles, além de fatores externos como doenças limitantes e estilo de vida (Guo et al., 2022).

No conceito genético, devido à clonalidade de seus genomas e à incapacidade de passar por transferência lateral de genes, as cepas do CMTB adquirem resistência a medicamentos principalmente por meio de variantes em genes vitais ou promotores, como no caso do gene *rpoB*, responsável pela estruturação da enzima RNA polimerase, ou na região promotora do gene *inhA*, responsável pela codificação da enzima catalase-peroxidase, fundamental na ativação da INH. (Meehan et al., 2019).

Algumas dessas variações já são muito bem conhecidas mutações no gene *rpoB*, particularmente na região determinante de resistência à RIF, sendo a causa mais comum de resistência à RIF. Entre as mutações mais frequentes estão *rpoB* S450L, D435V e H445Y/R (Stephanie; Saragih; Tambunan, 2021).

Os principais fármacos já possuem mutações identificadas hoje como: INH (alterações nos genes *katG* e *inhA* e na região promotora do *inhA*); RIF (no *rpoB*); SM (nos genes *rpsL* e no fragmento do gene *rrs-F2*); PZA (no gene *pncA* e no seu promotor); EMB (no gene *embB*); FQs (no gene *gyrA* e *gyrB*);

Mutações no gene *katG*, que codifica a enzima catalase-peroxidase necessária para ativar a isoniazida, são uma das principais causas de resistência ao fármaco. A mutação mais comum é *katG* S315T (Stephanie; Saragih; Tambunan, 2021). Outras variações menos comuns podem ser encontradas. Mutações no gene *inhA*, que codifica uma enoil-ACP redutase envolvida na síntese de ácido micólico, também podem conferir resistência à INH (Khawbung; Nath; Chakraborty, 2021).

A resistência à FQs como a moxifloxacina e ofloxacina se concentra principalmente em mutações nos genes *gyrA* e *gyrB*, que codificam as subunidades da DNA girase. Entre as mutações mais comuns estão *gyrA* D94G/Y/A e A90V (Shivakumar; Shettigar, 2023).

O tratamento da TB torna-se significativamente mais desafiador devido à contínua emergência de novas variações genéticas e consequentemente fenotípicas nos perfis de resistência, que, apesar de pouco frequentes, fatores como novas mutações, epistasia e mutações compensatórias tornam a caracterização do perfil de resistência um desafio (Nguyen et al., 2019; Khawbung; Nath; Chakraborty, 2021).

De acordo com os dados da WHO, estima-se um total de 410.000 novos casos de TB-MDR e TB-RR no ano de 2022, sendo estas as variações mais preocupantes, uma vez que se trata de uma emergência global (WHO, 2023; Conkle-Gutierrez et al., 2024). É importante observar que menos da metade desse número (175.650) iniciou um tratamento adequado, o que representa uma queda em relação ao período pré-pandêmico em 2019, quando foram iniciados 181.533 tratamentos baseados na recomendação oficial da WHO (WHO, 2023).

Apesar do contínuo avanço em todos os âmbitos, a tuberculose droga resistente (TB-DR) continua a ser um desafio significativo para os esforços globais de controle da TB (Nguyen et al., 2019). Mais pesquisas são necessárias para melhorar a compreensão dos mecanismos de resistência aos fármacos, desenvolver melhores testes diagnósticos moleculares e facilitar o desenvolvimento de novos medicamentos para melhorar o tratamento dessa doença, além da identificação de novos padrões de transmissão e resistência bacteriana (Coll et al., 2015).

Além da resistência a fármacos atribuída a características celulares específicas, como a composição da parede celular, e o mecanismo de bomba de efluxo, a genética tem um papel fundamental no que diz respeito ao desenvolvimento da resistência (Kalscheuer et al., 2019). A frequência e os tipos das mutações variam de acordo com vários parâmetros, como, região geográfica, padrão de resistência, e o contexto genético da bactéria (Nguyen et al., 2019).

Diversos determinantes genéticos foram identificados na literatura e associados aos fármacos de primeira linha, como a RIF e a INH, assim como para os de segunda linha, como FQs e injetáveis (Cohen et al., 2019; Koleske; Jacobs; Bishai, 2023). Estudos anteriores, como no caso de McGrath e colaboradores (2014) já demonstraram que, em cepas de MTB, a resistência à fármacos é majoritariamente adquirida através de mutações espontâneas, especialmente SNPs, em seu único cromossomo circular.

Para cada fármaco anti-TB, mutações em um ou vários genes foram descritas, e para cada uma, diferentes níveis de resistência foram identificados. As mutações relacionadas à resistência conhecidas mundialmente são comumente associadas com alto nível de resistência e baixo nível de custo de aptidão (Nguyen et al., 2019).

Muitos dos determinantes de resistência foram descobertos antes da conclusão do sequenciamento do genoma do *MTB*. Até 1998, os mecanismos de resistência já haviam sido descobertos para os medicamentos clássicos de primeira e segunda linha para TB, como as clássicas mutações para os medicamentos de primeira linha (RIF, EMB, PZA, INH), listados a seguir (Tabela 3) (Ramaswamy; Musser, 1998).

Já no caso de medicamentos de segunda linha injetáveis como canamicina, amicacina e capreomicina (no gene *rrs*), a Tabela 3 evidencia algumas das mutações mais frequentemente catalogadas (Nguyen, 2016; Cohen et al., 2019).

Tabela 3 - Mutações de resistência frequentemente associadas à resistência a drogas encontradas em isolados clínicos de MTB.

Alvo ou região genética	Resistência associada	Mecanismo de resistência	Referência
<i>gyrB/gyrA</i>	Moxifloxacino e levofloxacino	Redução da afinidade da enzima DNA girase A e B com a droga.	Gagneux et al., 2006
<i>rpoB/rpoC</i>	Rifampicina	Decréscimo da afinidade da enzima DNA polimerase com a droga.	Telenti et al., 1993
<i>rpsL</i>	Estreptomicina	Redução da da afinidade do alvo ribossomal à droga.	Sreevatsan et al., 1996
<i>rrs</i>	Estreptomicina, amicacina, canamicina e capreomicina	Redução da da afinidade do alvo ribossomal à droga.	Nessa et al 2011; Campbell et al. 2011
<i>inhA</i>	Isoniazida e etionamida	Redução da afinidade com a droga.	Hazbón et al., 2005
<i>inhA</i> promotor	Isoniazida	Superexpressão da enzima NADH-ACP-redutase.	Nguyen et al., 2016
<i>katG</i>	Isoniazida	Redução da ativação do pró-fármaco.	Gagneux et al., 2006
<i>tlyA</i>	Capreomicina	Impedimento da metilação do rRNA, tornando os ribossomos resistentes.	Campbell et al., 2011
<i>pncA</i> e promotor	Pirazinamida	Redução ou perda da ativação do pró-fármaco.	Campbell et al., 2011
<i>atpE</i>	Bedaquilina	Decréscimo da afinidade da enzima ATP-sintetase com a droga.	Andries et al., 2014
Operon <i>embCAB</i>	Etambutol	Decréscimo da afinidade da arabinosil-transferase com a droga.	Sreevatsan et al. 1997

Fonte: O autor.

Mutações na região de 1400 a 1500 do gene *rrs* (codificador da subunidade 16S rRNA) são reconhecidas como o principal mecanismo de resistência aos fármacos de segunda linha injetáveis, abrangendo entre 30% e 90% dos isolados resistentes a medicamentos globalmente, sendo a mutação 1041A>G conhecida por altos níveis de resistência e desfechos desfavoráveis (Campbell et al., 2011; Georghiou et al., 2017). Entretanto, outras mutações como na região promotora *eis* e no gene *ethA* (codificador da enzima monooxigenase) podem conferir resistência a medicamentos de segunda linha como amicacina, canamicina, capreomicina e etionamida.

As mutações relacionadas à resistência bacteriana já identificadas servem como base para a construção de de diagnóstico como o teste de hibridização da sonda em linha; microarranjos de DNA; as diversas metodologias baseadas em testes de amplificação, como a qPCR e o Xpert RIF/MTB (Nguyen et al., 2019).

Além das previamente citadas causas de TB-DR, estudos recentes também ressaltam a importância da diversidade genética intra-hospedeiro neste quesito. Trata-se de quando as alterações genéticas que desenvolvem resistência bacteriana ocorrem no indivíduo infectado. (Vázquez-Chacón et al., 2022).

Ao analisar a arquitetura genética destas populações minuciosas em alta resolução através da metodologia de WGS (500-1000x), foi possível esclarecer a microevolução, emergência e persistência de cepas resistentes (Lee et al., 2020; Vázquez-Chacón et al., 2022). Isto corrobora com evidências formadas anteriormente acerca da montagem do perfil de resistência do MTB, o qual é melhor atingido quando há uma comparação entre as mutações detectadas que conferem resistência ao bacilo (Miotto et al., 2017).

A confiabilidade do WGS é determinada pelas associações genótipo-fenótipo conferidas por mutações de resistência individuais (Dookie et al., 2022). Nos últimos 20 anos, o WGS tem avançado significativamente no estudo da resistência a medicamentos em populações de MTB. Essa abordagem permitiu uma compreensão mais ampla das características genéticas envolvidas no MTB, tanto em ambientes laboratoriais quanto naturais. Como resultado, novos mecanismos de resistência a medicamentos foram identificados, e os mecanismos de ação de novos medicamentos foram esclarecidos (Cohen et al., 2019).

2.3 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE MTB

O sucesso no diagnóstico da TB-DR é dependente de um teste de sensibilidade a drogas (TSD) que trará evidências sobre a resistência bacteriana, para que uma estratégia terapêutica eficaz seja recomendada (WHO, 2023). Os TSDs são divididos entre testes fenotípicos e genotípicos. Os primeiros são aqueles que se observa o crescimento ou a inibição metabólica em ambientes livres e contendo fármacos anti-TB (Jang; Chung, 2020). São baseados em testes *in vitro* em meio sólido ou líquido, com base na adição de ovo e ágar, como é caso do meio LJ (sólido) ou caldo Middlebrook 7H9 (Schön et al., 2017; Gill et al., 2022). Os testes são realizados tanto em ambientes com adição de fármacos anti-TB, quanto na ausência delas, sendo os métodos de proporção e concentração absoluta os mais comuns (Gröschel et al., 2021). Estes métodos apresentam boa sensibilidade e correlação clínica, e permitem a determinação de medidas de concentração inibitória mínima para classificar a cepa como resistente ou sensível (WHO, 2021).

Apesar de eficientes, as mais recentes diretrizes consolidadas sobre o diagnóstico da tuberculose fornecidas pela WHO, requerem o diagnóstico rápido e a triagem eficiente de pacientes (WHO, 2023). Os testes fenotípicos tradicionais não se encaixam neste padrão, uma vez que, mesmo acessíveis e de baixo custo, demanda de 2 a 3 meses para completá-los e entregar o diagnóstico final (Miotto et al., 2018; WHO 2021). Além disso, foram relatados casos em que estes métodos deixam passar despercebidos pequenos níveis de resistência associados à mutações no gene *rpoB* (Miotto et al., 2018). Também já foram observados problemas com disparidade do diagnóstico fenotípico com o genotípico, além de possui chances de falha, uma vez que o ensaio pode ser contaminado, e, consequentemente invalidado (Williamson et al., 2012).

Na tentativa de superar as limitações foram desenvolvidos novos TSDs baseados na utilização de meio de cultura líquida. Destaca-se o Tubo Indicador de Crescimento Micobacteriano (MGIT), aprovado pela WHO como TSD fenotípico. Neste caso, é imprescindível que a concentração crítica seja padronizada em 0,5 mg/ml para minimizar a discordância entre métodos genotípicos e fenotípicos (Gupta; Ish; Malhotra, 2021). Outro método relevante é o BACTEC MGIT 460, que detecta a produção de dióxido de carbono. Ambos os métodos são capazes de proporcionar diagnóstico em até um mês (Jang; Chung, 2020; WHO, 2021).

Os testes genotípicos possuem a capacidade de detectar genes associados à resistência a medicamentos (Jang & Chung, 2020). Complementares aos testes fenotípicos, os testes de diagnóstico molecular foram desenvolvidos para oferecer uma vantagem sobre os métodos convencionais, reduzindo significativamente o tempo necessário para obter resultados. Além disso, quando os dois métodos são associados, há um aumento na eficácia e na confiabilidade do diagnóstico (Suárez et al., 2015; Groschel et al., 2021).

Considerando a importância da detecção precoce do perfil de resistência micobacteriana para a seleção e acesso a um tratamento eficaz, bem como para prevenir a subsequente transmissão da doença, torna-se necessária a personalização da estratégia terapêutica com base nos resultados dos TSDs fenotípicos e genotípicos. Isso visa aprimorar a eficácia do tratamento e minimizar a exposição a medicamentos tóxicos e ineficazes (Coll et al., 2015).

Durante as últimas décadas, várias abordagens moleculares foram desenvolvidas e funcionam como métodos de triagem para identificação de resistência de forma rápida. Entre os aprovados pela WHO, destacam-se: o GenoType MTBDRplus 1.0 (Hain Lifescience), uma abordagem de hibridização com sonda em linha; Truenat MTB, MTB Plus e MTB RIF (Molbio Diagnostics), e GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, USA), micro ensaios baseados em qPCR que são capazes de identificar a resistência a RIF (marcador de TB-MDR) em poucas horas (Schön et al., 2017; Huang et al., 2022).

Embora existam soluções que identifiquem padrões de resistência pontuais, ainda permanecem alguns desafios a serem sanados quanto à identificação de resistência bacteriana. As metodologias mencionadas acima não são capazes de traçar um perfil de resistência completo, uma vez que apenas alguns fármacos são avaliados utilizando alvos específicos (Huang et al., 2022). Entretanto pesquisadores ao redor do mundo estão empenhados em desenvolver metodologias de diagnóstico que resolvam este impasse. Como exemplo tem GenTB, uma solução que promove a extração de dados de resistência a 13 drogas anti-TB de uma amostra de sequenciamento Illumina, e valida-as através de modelos de aprendizado de máquina (Gröschel et al., 2022).

Outro problema importante é a confiabilidade na associação entre métodos fenotípicos e genotípicos, que desempenha um papel fundamental na determinação do perfil de resistência bacteriana. Muitas vezes, esses métodos não correspondem de maneira precisa, resultando em alguns casos sem a cobertura ideal para o direcionamento correto do tratamento do paciente. Essa discordância é considerada um problema clínico significativo (Gupta; Ish; Malhotra, 2021).

Enquanto testes baseados em PCR e hibridização de sonda de linha (LPA) são rápidos e acessíveis, sua eficiência é prejudicada pela inability de detectar mutações relevantes fora do escopo que foram desenvolvidas (Coll et al., 2015).

Embora indubitavelmente úteis, ambas as tecnologias são limitadas no número de loci que examinam e não têm capacidade de diferenciar mutações silenciosas daquelas que afetam a eficácia da droga de efeito, levando a resultados falso-positivos (Gill et al., 2022). Outra limitação é a incapacidade de diferenciar mutações silenciosas daquelas que promovem a pressão seletiva que dificulta o mecanismo de ação dos fármacos, culminando no aumento da taxa de diagnósticos de TB-DR falso-positivos (Alonso et al, 2011).

A correlação e verossimilhança entre dados fenotípicos e genotípicos advindo de resultados de TSDs permanece uma problemática, devido ao conhecimento insuficiente das mutações subjacentes e aquelas ainda desconhecidas que conferem resistência aos medicamentos (Koh et al., 2012; MacLean et al., 2020).

2.3.1 Tubo indicador de crescimento micobacteriano (MGIT)

O BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Reino Unido), um sistema automatizado de cultura líquida, é amplamente utilizado para cultivar a maioria das espécies de micobactérias clinicamente relevantes (Votintseva et al., 2015). Implementado desde 1995, trata-se de um sistema semi-automatizado que é capaz de monitorar continuamente a fluorescência emitida devido ao crescimento micobacteriano (Ardito et al., 2001).

O meio de cultura utilizado na metodologia é composto por caldo Middlebrook 7H9 modificado, alocado num tubo de teste com uma borracha de silicone impregnada com um sensor que detecta o oxigênio advindo da têmpera de fluorescência. Além de ser um teste não invasivo, e que não utiliza recursos radioativos, elimina dificuldades

encontradas no diagnóstico via cultura, como tempo e visualização de colônias no meio LJ (Ardito et al., 2001).

Endossado pela WHO, esta metodologia foi avaliada extensivamente como um TSD para ambas primeira e segunda linhas de fármacos anti-TB (Springer et al., 2009). Embora seja uma metodologia que requer alto custo, comparada a outras como baciloscopia e cultura convecional, o MGIT é bem estabelecido, padronizado e entrega um perfil de resistência micobacteriana com base em concentrações críticas. O tempo para se verificar o crescimento bacteriano varia entre 4 e 12 dias (Cambau et al., 2015; WHO; 2023).

Apesar das vantagens, o MGIT é, assim como as outras metodologias fenotípicas, passíveis de erro. Um estudo de suscetibilidade à PZA conduzido por Chedore e colaboradores, em 2009, testou 743 isolados de MTB, onde o MGIT detectou 57 (7,7%) resistentes à PZA. Entretanto, apenas 33 (4,4%) foram realmente confirmados como resistentes através da atividade da enzima pirazinamidase (Chedore et al., 2009).

Curiosamente, nenhum dos resultados discordantes mostraram mutações no gene comumente associado à resistência à PZA (*pncA*). Isso reforça a necessidade de uma abordagem mais ampla a fim de uma maior cobertura de outras mutações que conferem resistência (Chedore et al., 2009).

Apesar de sua importância, diversas restrições têm impedido a implementação generalizada das culturas de micobactérias como procedimento de rotina para o diagnóstico laboratorial da tuberculose. Essas restrições incluem a necessidade de infraestruturas especializadas, equipamentos e pessoal qualificado, a manutenção do nível de biossegurança 3 adequado, o fornecimento ininterrupto de energia elétrica, os custos envolvidos, entre outros obstáculos (Machado; Couto; Viveiros, 2019).

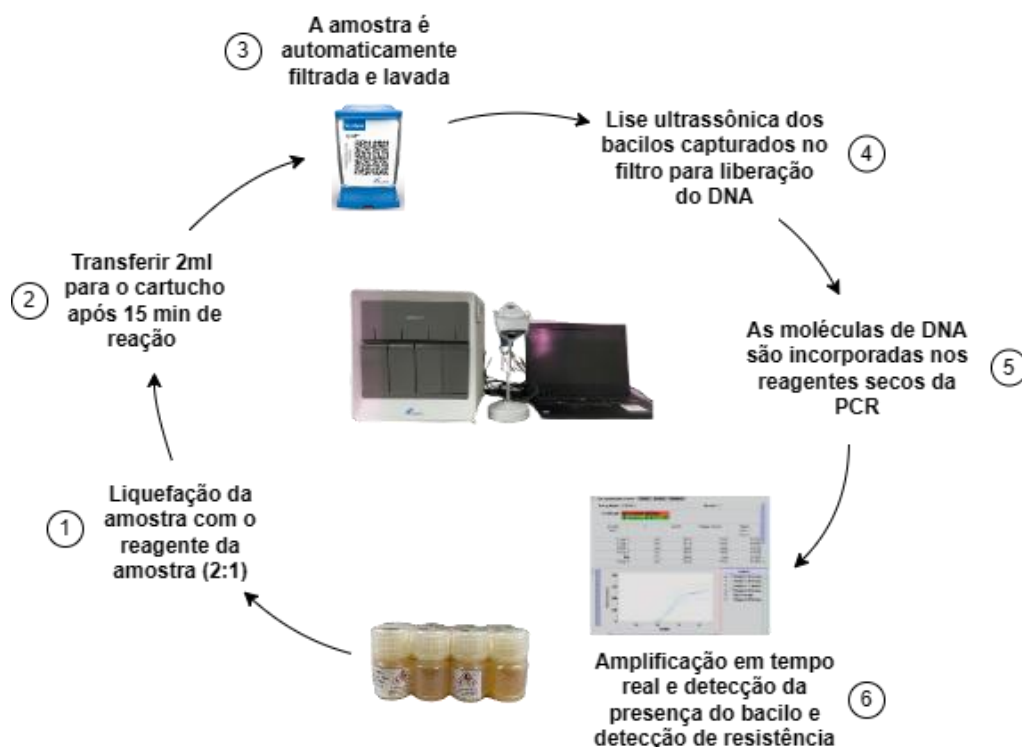
2.3.2 Xpert MTB/RIF e Xpert MTB/RIF Ultra

No Brasil, o método genotípico do teste rápido molecular (TRM) Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) foi lançado em 2004, autorizado em 2010 e implementado em 2014, com o foco de realizar o diagnóstico de casos de TB rRIF resistente (TB-RR), em concordância com a WHO (Sieiro et al., 2018; Brandao et al., 2020). O sistema consiste em um equipamento, um computador, um leitor de código, e utiliza um cartucho que contém os reagentes liofilizados, tampões e soluções. A detecção e caracterização do alvo são realizadas em tempo real, usando um dispositivo a laser de detecção de seis cores (Figura 8) (Brasil, 2022).

O método automatizado utiliza-se da técnica de amplificação de ácidos nucléicos através de PCR multiplex com *nested* em tempo real (Sieiro et al., 2018; Brandão et al., 2020). Com o auxílio do sistema GeneXpert, o ensaio realiza a amplificação da região central de 81 pares de bases do gene *rpoB*, especificamente regiões determinantes de resistência à RIF como o alvo *IS6110*. Essas sequências se repetem por mais de 25 vezes no genoma do CMTB, sendo altamente específico (Brandão et al., 2020).

Posteriormente, essas regiões são detectadas por cinco sondas moleculares únicas e utilizando três primers específicos para garantir alta especificidade na detecção de TB-RR (Machado; Couto; Viveiros, 2019; Acharya et al., 2020; Huang et al., 2022). O ensaio permite a detecção do MTB e MTB-RR em aproximadamente duas horas, eliminando o problema de contaminação cruzada por causa de cartuchos independentes (Huang et al., 2022).

Figura 8 - Fluxograma de processamento do ensaio Xpert MTB/RIF.



Fonte: O autor

Em 2017, a WHO recomendou o Xpert MTB/RIF Ultra, a próxima geração do Xpert MTB/RIF, como o teste diagnóstico inicial de TB para adultos e crianças, independentemente do status de HIV, em vez de baciloscopia e cultura (WHO, 2021). Enquanto a versão mais moderna apresenta uma sensibilidade ligeiramente superior, atingindo 88% em comparação com os 85% do Xpert MTB/RIF. Já sua especificidade é um pouco menor, com 96% em contraste dos 98% do método anterior (WHO, 2021; MacLean et al., 2020).

Além disso, o Xpert MTB/RIF Ultra possui um limite de detecção mais baixo, de 16 CFU/ml, e utiliza dois alvos de amplificação multicópia para MTB, *IS6110* e *IS1081*, enquanto o Xpert MTB/RIF utiliza apenas o *IS6110*. Com dois alvos, a versão mais moderna se tornou capaz de detectar MTB em amostras paucibacilares, inclusive alguns tipos de amostras extrapulmonares (Dorman et al., 2018; Machado; Couto; Viveiros, 2019; Silva et al., 2021).

Ambos os ensaios são capazes de detectar resistência à RIF. Entretanto, mesmo o Xpert MTB/RIF Ultra pode se comprometer quanto à sua especificidade em certos cenários clínicos, como em pacientes com infecções recentes por TB, ou coinfeção TB-HIV pela sua capacidade de detectar bacilos não-viáveis (Maclean et al., 2020). Este cuidado torna-se relevante para países como o Brasil, que possui um cenário propício a estes casos (Campos, 2006).

Apesar das múltiplas vantagens, o ensaio Xpert MTB/RIF, e Xpert MTB/RIF Ultra apresenta diversas limitações já identificadas. Isso inclui o custo potencialmente proibitivo do equipamento e seus cartuchos, bem como a necessidade de infraestrutura específica e manutenção para uma operação ideal (Machado; Couto; Viveiros, 2019).

Embora muitas das limitações do ensaio Xpert MTB/RIF sejam superadas pela versão Xpert Ultra, ainda existem algumas restrições que impedem que ele seja considerado um teste ideal (Dorman et al., 2018). Além da questão da especificidade variável, destaca-se a limitação na detecção de resistência a medicamentos e a análise de regiões genéticas restritas apenas à RIF (Dookie et al., 2022). Isso ressalta a necessidade de uma abordagem mais abrangente para casos de TB-MDR e TB-XDR (MacLean et al., 2020).

2.3.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

O sequenciamento de nova geração (do inglês *New Generation Sequencing* – NGS) é a tecnologia atual mais indicada para analisar rapidamente o genótipo de um organismo, sendo capaz de fornecer dados de um genoma completo em 8-24 horas a depender do método utilizado (Nguyen et al., 2019; Dookie et al., 2022). O NGS permite determinar a sequência de DNA ou RNA para estudar variações genéticas associadas a doenças e outros fenômenos biológicos (Slatko; Gardner; Ausubel, 2018).

A necessidade que levou ao desenvolvimento do NGS, também conhecido como sequenciamento de segunda geração, veio para suprir a necessidade de um processamento genômico de grande porte genômico. Com menor custo, e maior praticidade, o NGS realiza milhões de sequenciamentos em paralelo, permitindo que grandes genomas que antes levavam anos para serem completamente sequenciados, agora sejam processados em horas (Slatko; Gardner; Ausubel, 2018).

A realização do NGS envolve quatro principais etapas, são elas: fragmentação de DNA, preparação de biblioteca, sequenciamento paralelo massivo, análise de bioinformática e anotação e interpretação de variantes/mutações (Qin, 2019). A etapa da fragmentação é utilizada para partir o DNA alvo em pequenos fragmentos de 100-300 pbs, onde as porções relevantes são isoladas através do ensaio de captura por hibridização. É também possível realizar esta etapa através da PCR, ensaio conhecido como amplicon. Posteriormente, estes fragmentos são usados para a preparação da biblioteca de sequenciamento (Qin, 2019).

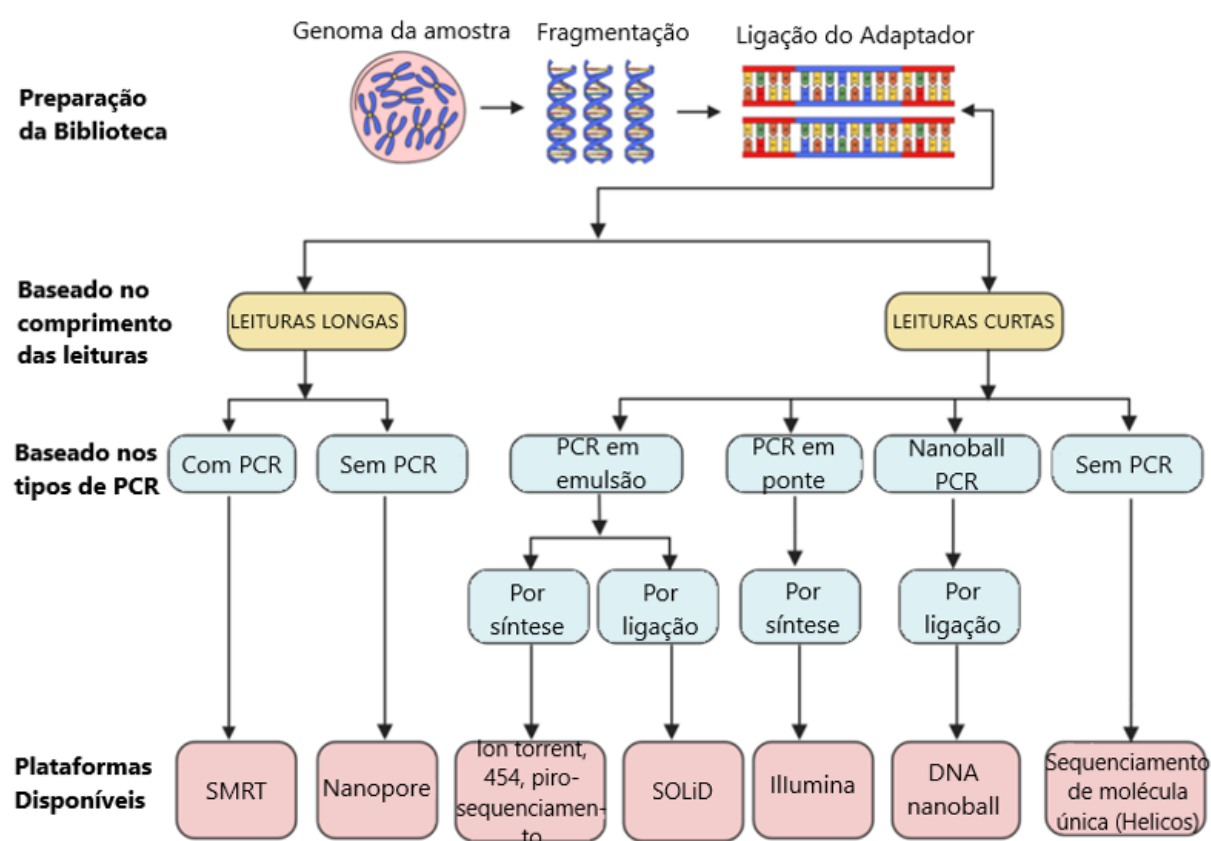
A construção da biblioteca de DNA-Seq envolve várias etapas essenciais: fragmentação aleatória do DNA, reparo das extremidades, ligação dos adaptadores, que inserem sequências específicas compatíveis com a plataforma de sequenciamento no fragmento de DNA, e a seleção do tamanho adequado do fragmento (Hu et al., 2021). Esses adaptadores não apenas identificam cada fragmento para sequenciamento multiplex, permitindo o agrupamento e sequenciamento simultâneo de várias bibliotecas em uma única execução, mas também garantem a compatibilidade com a plataforma utilizada. (Hu et al., 2021).

Embora haja várias etapas, esse procedimento foi otimizado pelas empresas pioneiras na metodologia. Um exemplo é a tecnologia Nextera da Illumina, que oferece um método alternativo para preparar fragmentos de DNA. Utilizando uma preparação de biblioteca através do processo de tagmentação *on-bead*, onde enzimas ligadas à pequenas esferas de poliestireno são capazes de integrar as etapas de fragmentação e seleção de tamanho do DNA (Hu et al., 2021). Após a tagmentação, uma PCR limitada é realizada para integrar os adaptadores para sequenciamento e barcoding para indexação e identificação da amostra, reduzindo o tempo de preparação das bibliotecas para menos de 15 minutos (Hu et al., 2021).

No sequenciamento de segunda geração, a etapa de sequenciamento propriamente dita incluem dois elementos consecutivos: amplificação clonal, e, posterior sequenciamento. A amplificação clonal envolve a amplificação de fragmentos de DNA em fase sólida para produzir sinais fortes e detectáveis durante o sequenciamento. (Goodwin; Mcpherson; Mccombie, 2016). Esta técnica envolve o sequenciamento massivo paralelo de pequenas *reads*, onde milhões de reações de sequenciamento ocorrem simultaneamente.

A plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq, empregada no nosso estudo, utiliza células de fluxo como fase sólida. Dependendo da plataforma, utiliza-se PCR por emulsão (Ion Torrent) ou PCR baseada em amplificação por pontes (Illumina). Ambas as abordagens baseadas em sequenciamento por síntese, que se trata de um fluxo que segue as etapas de hibridização, amplificação e fragmentação do DNA que envolve a incorporação de nucleotídeos dependente da DNA polimerase na cadeia de DNA estendida (Hu et al., 2021) Uma visão geral das várias tecnologias NGS com diferentes princípios e plataformas são observadas na figura 9.

Figura 9 - Visão geral das várias tecnologias NGS com diferentes princípios e plataformas.



Fonte: Adaptado de Satam et al., 2023

Após a obtenção dos dados do sequenciamento, realiza-se a etapa de análise de dados, que é tipicamente subdividida em primária secundária e terciária. A etapa primária é comumente realizada pelo software inclui a chamada de bases e procedimentos de controle de qualidade. As sequências, juntamente com os valores de qualidade, são armazenadas em formato FASTQ (Pereira; Oliveira; Sousa, 2020).

A análise secundária inclui o alinhamento do genoma sequenciado contra o genoma de referência e a chamada das variantes. Uma das métricas desta etapa é a verificação de qualidade por cobertura, que inclui a profundidade de leitura (quantidade de vezes que uma base é sequenciada) e abrangência de leitura. Após o alinhamento, as variantes genômicas, SNPs, indels ou variantes estruturais são identificadas através da comparação com o genoma de referência (Sims et al., 2014; Pereira; Oliveira; Sousa, 2020). Por fim, a análise terciária é composta pela anotação de variantes e a interpretação dos resultados, obtendo assim as funções biológicas de cada alteração encontrada (Hu et al., 2021).

2.3.4 Sequenciamento de Genoma Completo (WGS)

Uma das principais abordagens para a utilização de NGS é o WGS, que emprega plataformas de sequenciamento de DNA para reconstruir a sequência completa do genoma de um organismo. Ao sequenciar todo o DNA genômico, o WGS permite a identificação de variações genéticas, desde SNPs até alterações estruturais maiores, como inserções, deleções e rearranjos. Dessa forma, essa metodologia torna-se ideal para o genoma de aproximadamente 4,4 Mb do cromossomo único do MTB (Meehan et al., 2019; Satam et al., 2023).

Diferentemente de métodos como o Xpert MTB/RIF, o WGS é capaz de identificar todas as mutações que potencialmente possam conferir resistência à fármacos ao organismo infectante, e, conseqüentemente, possibilitar a individualização do esquema terapêutico (Acharya et al., 2020; Cox et al., 2022).

A identificação exata do agente etiológico em infecções microbianas é fundamental para a medicina de precisão (Satam et al., 2023). Os dados úteis gerados por meio de NGS na identificação microbiana e genotipagem de resistência a medicamentos, como no caso do MTB, têm se mostrado importantes para a vigilância de doenças, contenção de surtos, estudos epidemiológicos de saúde pública, formulação de políticas e intervenções terapêuticas rápidas (Meehan et al., 2019; Satam et al., 2023).

A capacidade do WGS de identificar não só infecções mistas, como também heterorresistência e padrões de transmissão que levariam a surtos e endemias provêm uma vantagem clínica importante sobre os outros métodos diagnósticos genéticos (Walker et al., 2013; Acharya et al., 2020; Dookie et al., 2022).

A análise completa do MTB através do WGS envolve vários pontos-chave como: validação e controle da qualidade de dados de entrada, mapeamento de um genoma de referência (frequentemente utiliza-se a cepa H37Rv), e detecção de variantes genômicas (Meehan et al., 2019). Vários protocolos de sequenciamento para MTB já existem, porém, um padrão único ainda não foi estabelecido (Machado; Couto; Viveiros, 2019).

Esses protocolos geralmente excluem cerca de 10% do genoma (família de genes PE/PPE, e outros genes repetitivos) devido a mapeamentos incorretos em certas regiões, o que resulta em falsas chamadas de variantes (Meehan et al., 2019). Com isso, vários outros critérios são aplicados como profundidade de leitura, qualidade da base e viés de fita para filtrar variantes falsas positivas. Com base nas variantes detectadas, várias tarefas podem ser realizadas, incluindo a previsão de perfis de resistência e suscetibilidade a medicamentos, tipagem de cepas e identificação de clusters de transmissão (Meehan et al., 2019).

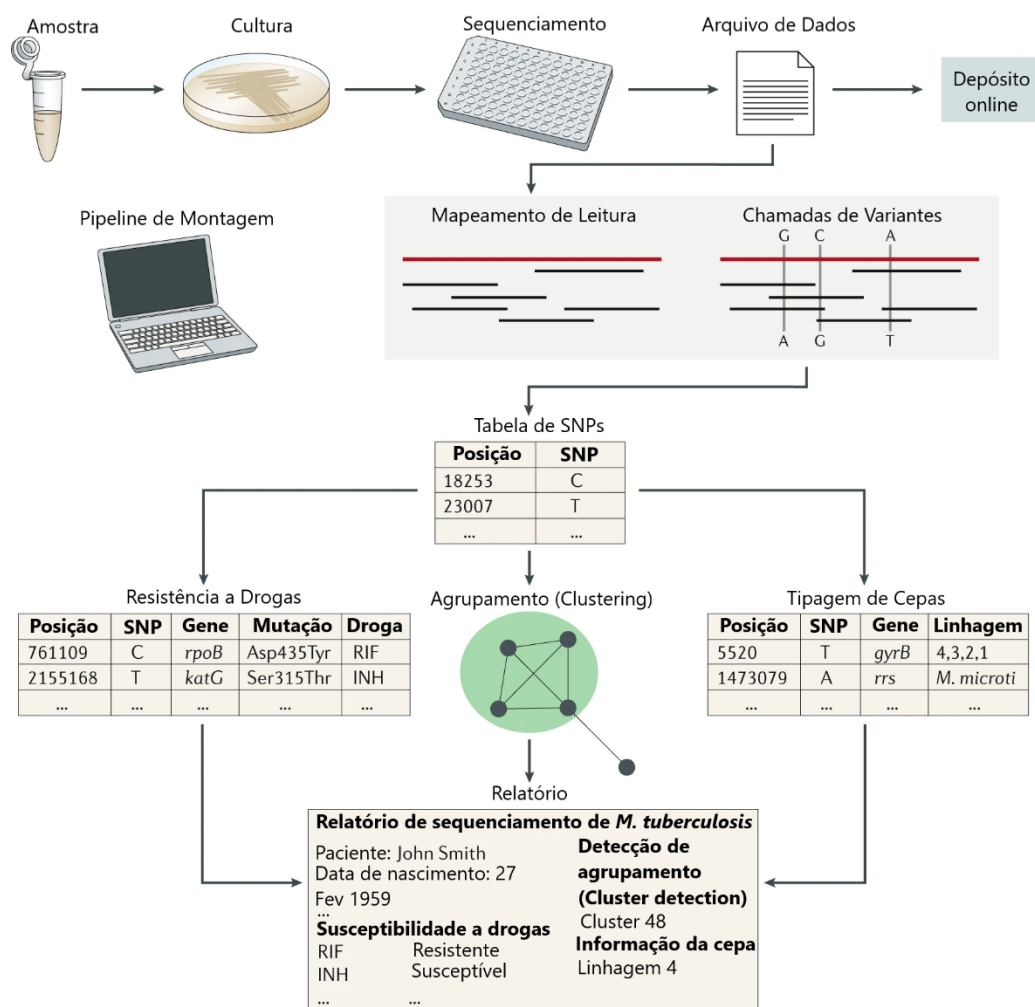
Os perfis de resistência e suscetibilidade a drogas podem ser determinados com alta precisão para muitos medicamentos usados no tratamento da TB, através da comparação das variantes genéticas encontradas no sequenciamento com listas de mutações genéticas de alta confiança associadas à resistência (Miotto et al., 2017). Essas listas foram estabelecidas principalmente usando associações genótipo-fenótipo identificadas a partir de análises estatísticas de grandes conjuntos de dados clínicos do WGS (Coll et al., 2015; Miotto et al., 2017).

Um dos grandes feitos da comunidade científica para estes bancos de dados foi o ReSeqTB, no qual pesquisadores de todo o mundo depositam agregados curados de informações genotípicas e fenotípicas, acerca de todas as linhagens do CTMB em escala mundial (STARKS et al., 2015). Outra iniciativa importante foi o projeto “*Comprehensive Resistance Prediction for Tuberculosis: an International Consortium*” (CRyPTIC), que apresenta um compêndio de mais de 12 mil isolados clínicos. Os isolados foram submetidos à análise por WGS com o objetivo de entender as relações entre as variantes genéticas e concentrações inibitórias mínimas para 13 fármacos anti-TB (CRyPTIC, 2022). Ao comparar SNPs presentes em um isolado sequenciado, é possível prever não apenas a resistência, mas também a susceptibilidade, informações fundamentais para a vigilância epidemiológica de qualquer país (Meehan et al., 2019).

Em concordância às evoluções, atualmente as principais abordagens do WGS para identificação de perfil de resistência se baseiam na comparação de SNPs com genomas de referência e identificação de *clusters* de transmissão associados às listas como as mencionadas anteriormente, sendo esta abordagem uma das mais robustas e confiáveis (Figura 9) (Meehan et al., 2019).

A constante evolução desta metodologia se deve à disponibilidade de sequências genômicas de várias linhagens, que permitem a comparação de diversos genomas globais do MTB e suas características genotípicas e fenotípicas. Estas incluem variações no número de cópias de genes, alterações na sequência de DNA e a ocorrência de inserções, deleções de múltiplos nucleotídeos e mutações pontuais, como SNPs (Chacravorty et al., 2017).

Figura 10 - Metodologia para sequenciamento completo do genoma de isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.



Legenda: Uma amostra clínica (frequentemente escarro) é primeiramente cultivada por até 6 semanas, seguida pela extração de DNA genômico e sequenciamento. A saída de sequenciamento (arquivos de dados fastq) pode ser depositada online em repositórios públicos e também processada por meio de metodologia de sequenciamento para identificação de mutações. Essas metodologias primeiro mapeiam as leituras em relação a um genoma de referência (frequentemente a cepa H37Rv de *M. tuberculosis*) e depois chamam variantes genômicas, criando uma tabela de SNPs. As listas resultantes de SNPs podem então ser usadas para uma variedade de análises, como tipagem de linhagem, agrupamento de transmissão e perfil de resistência a medicamentos. Os resultados dessas tarefas são então relatados ao usuário final (por exemplo, um clínico ou pesquisador).

Fonte: Adaptado de Meehan et al., 2019

No que diz respeito à comparação com testes fenotípicos, no estudo de Jajou e colaboradores (2019) o WGS foi utilizado como metodologia para prever a susceptibilidade do MTB aos medicamentos de primeira linha, comparando o resultado ao teste fenotípico MGIT. Os resultados evidenciaram um valor preditivo negativo de 99,3% no tocante ao WGS, evidenciando discrepância de alguns resultados do teste fenotípico. Isso demonstra o potencial do WGS como metodologia de primeira linha para predição de resistência, e sugere que o WGS não necessita do auxílio de resultados fenotípicos para traçar o perfil da infecção e predição de resistência à medicamentos (Jajou et al., 2019)

Estas vantagens oferecem novas oportunidades tanto em pesquisas, quanto no campo da saúde pública incluindo o diagnóstico laboratorial da TB, e a epidemiologia molecular (Nikolayevskyy et al., 2016; Gill et al., 2022). Porém, a adoção deste método em países de baixa renda com alta carga de TB ainda é um desafio, devido aos custos financeiros, mão de obra técnica especializada e padronização da análise bioinformática (Acharya et al., 2020). Em contrapartida, a predição precisa de resistência bacteriana a partir de dados genômicos é um desafio maior em todos os contextos (Cox et al., 2021).

Curadorias de grandes conjuntos de dados derivados globalmente (ex.: ReSeqTB), demonstram grande interesse em continuar a descrever associações entre mutações e resistência fenotípica (Meehan et al., 2019). Esse trabalho de elucidação contribui para a saúde pública mundial, possibilitando trabalhos oficiais, como o recente catálogo da WHO de mutações do MTB que conferem resistência bacteriana a drogas de primeira e segunda linha (WHO 2021b).

Embora existam algumas desvantagens, mais com relação na necessidade de infraestrutura, o potencial desta metodologia encoraja o desenvolvimento de novas abordagens visando a melhoria das lacunas a serem preenchidas, como o sequenciamento diretamente de uma amostra de escarro. Hoje uma realidade não só possível, como também um progresso substancial, uma vez que a abordagem identificou maior diversidade genética do que diretamente da amostra de cultura (Nguyen et al., 2019; Nimmo et al., 2019). Isso se dá graças a estratégias inovadoras como o enriquecimento do DNA alvo (Nimmo et al., 2019).

Ademais, com os avanços tecnológicos em abordagens de diagnóstico da TB baseadas em microfluidos, é possível determinar o potencial do WGS como um teste do tipo *point-of-care*, uma vez que o WGS é capaz de realizar multiplexação e cobrir várias amostras por análise (Acharya et al., 2020; Gill et al., 2022). Em termos de tempo de resposta, o WGS é capaz de reduzir o tempo de resultados em até uma semana, o que traz uma economia de tempo considerável na obtenção do resultado (Acharya et al., 2020).

Seguindo a linha de raciocínio dos estudos baseados na utilização do WGS, é possível confirmar a importância da sua utilidade no contexto das investigações epidemiológicas. Apesar do custo de implementação e manutenção, numa escala macroscópica, a economia do dinheiro e recursos das equipes de saúde pública saem em vantagem (Nikolayevskyy et al., 2016).

A melhoria na precisão da predição dos padrões de resistência, juntamente com bons valores preditivos e excelente reprodutibilidade, faz do sequenciamento de genoma completo (WGS) uma ferramenta poderosa na prevenção de erros e atrasos no diagnóstico. Além disso, o WGS permite a detecção precoce de resistência em nível molecular, antes que ela se manifeste clinicamente, proporcionando um direcionamento mais eficaz do tratamento (Votintseva et al., 2015; Nikolayevskyy et al., 2016; Miotto et al., 2017). Essa abordagem não apenas acelera o processo diagnóstico, mas também melhora significativamente os resultados clínicos ao permitir intervenções terapêuticas mais precisas e personalizadas (Coll et al., 2015).

Em países de alta carga para a TB e renda média, como o Brasil, isso se torna muito importante, uma vez que há uma preocupação quanto à necessidade de expertise clínica para a prescrição de um tratamento individualizado (Cox et al., 2021). Para isso, algumas estratégias baseadas em soluções de ponta a ponta com o uso computação em nuvem é um possível passo lógico para a implementação do WGS em países como o Brasil, semelhante à implementação de sistemas de qPCR (Gröschel et al., 2022). Entretanto, ainda existe a necessidade de profissionais experts na metodologia diagnóstica molecular nestes países (Meehan et al., 2019).

O cenário de esforço constante para o uso do WGS como ferramenta de predição de resistência e individualização do tratamento corrobora com o plano END-TB, implementado pela WHO em 2016, que visa reduzir incidência (90% até 2023), mortalidade, e morbidade da TB (95% até 2023), assim como desenvolver estratégias terapêuticas e diagnósticas através de inovação em pesquisa e educação (Gill et al., 2022; WHO, 2023).

Diante disso, o estudo realizado neste trabalho visa utilizar o WGS como ferramenta contribuinte com a predição eficiente e precoce principalmente da TB-MDR, visando direcionar o tratamento dos pacientes com regimes terapêuticos especializados. Isto melhoraria o prognóstico dos pacientes, aumentaria a adesão dos pacientes ao tratamento, contribuindo assim com os programas de controle da tuberculose no Brasil (Cox et al., 2021; Brasil, 2024).

Ademais, seguindo o propósito do avanço tecnológico e desenvolvimento científico no Brasil, o presente trabalho trata-se de uma grande contribuição científica e clínico-diagnóstica para o desenvolvimento de uma plataforma tecnológica para a rápida predição de droga resistência micobacteriana. Possibilitando também a geração de dados em tempo real para possível integração com a saúde pública, voltada para um serviço de vigilância em saúde no país.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL

Avaliar a resistência de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* do ponto de vista genotípico e fenotípico comparando os diferentes métodos de diagnóstico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fenotipicamente o perfil de droga resistência das culturas de cepas de MTB de uma amostragem clínica aleatória de pacientes com TB droga resistente;
- Avaliar genotipicamente a resistência das cepas MTB à RIF por teste rápido molecular;
- Realizar o sequenciamento de genoma completo das cepas de MTB para identificação do perfil de resistência;
- Comparar do perfil de resistência de cepas de MTB apresentados pelos diferentes métodos de identificação de resistência;
- Identificar de *clusters* genômicos e determinação das linhagens filogenéticas das cepas de MTB;
- Avaliar o desempenho do WGS enquanto método de predição de resistência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMO

Foram utilizadas 30 cepas de amostragem clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* droga resistente (TB-DR), compondo cepas de TB multidroga resistente (TB-MDR) e TB extensivamente resistente aos medicamentos (TB-XDR). Estas cepas foram obtidas a partir de uma amostragem de isolados clínicos aleatórios de cepas de MTB droga resistente confirmados laboratorialmente, provenientes do Laboratório Central Público de Pernambuco (LACEN-PE).

Todas as 30 cepas de MTB foram analisadas pelo Teste de sensibilidade às drogas (TSD) fenotípico MGIT960 SIRE kit (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) para determinar o perfil de resistência a pelo menos um medicamento de primeira. Dentre estas, 21 foram submetidas a dois TSDs moleculares: o sequenciamento de genoma completo (WGS) e o Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, USA).

As cepas de MTB foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), com 0,2% de glicerol e 0,05% de Tween 80. Após o tempo de incubação mínimo de 14 a 21 dias, as cepas foram inoculadas através de repique em meio de cultura Lowenstein-Jensen (LJ), onde foram mantidas pelo mesmo período para crescimento.

4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE ÀS DROGAS ANTI-TB FENOTÍPICO

Como metodologia para identificação fenotípica de resistência à fármacos anti-TB, utilizamos o método baseado em cultura líquida automatizada para detecção de micobactérias, o MGIT 960 SIRE kit (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a preparação do inóculo, algumas colônias (2-3) foram isoladas e diluídas em um frasco contendo pérolas de vidro e 2 mL de água destilada estéril para obtenção de turbidez maior que o tubo 1 na escala de McFarland. O conteúdo do frasco foi submetido à agitação até a diluição total das colônias e mantido em repouso por 20 minutos, em temperatura ambiente, para reduzir a propagação de aerossóis. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon estéril de 15mL, onde a suspensão permaneceu por mais 15 minutos em repouso a temperatura ambiente. Utilizando o meio 7H9, a suspensão foi ajustada para o padrão 0,5 de McFarland. 1 mL da suspensão ajustada foi diluído em 4 mL de solução salina estéril (diluição de 1:5).

Uma alíquota de 0,5 mL das diluições 1:5 foi inoculada em tubos contendo os fármacos de teste RIF, INH, EMB e RIF. Na preparação do tubo de controle de crescimento (do inglês, *growth control* – GC) de drogas de segunda linha, 0,1 mL da suspensão mencionada anteriormente foi pipetada em um total de 10 mL de solução salina estéril para preparar as suspensões 1:100 (GC a 1%). A suspensão GC foi misturada através de inversão suave por 3 a 4 vezes e então inoculada com 0,5 mL das suspensões 1:100 GC em tubos MGIT.

Para interpretar os resultados dos fármacos de segunda linha, seguiu-se o protocolo padrão recomendado pelos fabricantes para o teste de sensibilidade a drogas (TSD) pelo método MGIT 960. Quando a unidade de crescimento (do inglês, *growth unit* – GU) do controle de crescimento alcançou o valor de 400, dentro de 4 a 13 dias, os valores de GU dos frascos contendo drogas foram avaliados. Quando o GU dos tubos contendo os fármacos foram 100 ou mais, os resultados foram relatados como cepas suscetíveis e resistentes, respectivamente.

As concentrações críticas utilizadas no teste foram 0,10g/mL para INH, 1,0g/mL para RIF, 5,0g/mL para EMB e 1,0g/mL para SM. Foram investigadas resistência fenotípica aos medicamentos anti-TB: SM, INH, RIF, e EMB.

4.3 XPERT MTB/RIF ULTRA

Para a utilização de amostras no equipamento Xpert MTB/RIF Ultra, cada cepa foi suspensa em 500 µL de água ultra pura, e posteriormente misturadas com 1.5mL do reagente de diluição do fabricante. Este reagente é capaz de isolar o DNA micobacteriano, concomitantemente eliminando as preocupações de biossegurança durante o procedimento. A mistura foi agitada vigorosamente em um vórtex por 20 segundos e permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos. Após este período de incubação, a mistura foi cuidadosamente transferida para o cartucho GeneXpert, uma unidade de teste fechada que contém todos os elementos necessários para a PCR, incluindo tampões e reagentes liofilizados. O cartucho foi então inserido no sistema GeneXpert, que automatiza a amplificação e detecção do DNA bacteriano do MTB através da detecção das sequências de inserções IS6110 e IS1081 e as região determinante de resistência a rifampicina do gene *rpoB*. Finalmente, os resultados foram enviados para um computador conectado ao equipamento, permitindo a análise e interpretação dos dados de resistência à RIF.

4.4 INATIVAÇÃO DAS CEPAS DE MTB E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As cepas de MTB em meio LJ foram resuspensas em 500µL de água ultrapura em tubos tipo Eppendorf de 1,5mL e submeridas a inativação a 100°C por 10min, e em seguida a -80°C por 10 min. Esse processo se repetiu por duas vezes. Posteriormente, foi adicionada lisozima (10mg/mL) seguida de incubação a 37°C por 60min para lise da parede bacteriana. Em seguida, a extração de DNA genômico de MTB foi realizada pelo método de *mini salting out* (Miller; Dykes; Polesky, 1988), com modificações *in house*.

A quantificação e a avaliação da qualidade do DNA purificado foram realizadas através do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher), considerando as razões 260/280 e 260/230.

4.5 SEQUENCIAMENTO DE GENOMA COMPLETO (WGS)

O sequenciamento do genoma completo das cepas MTB-DR foi realizado no Núcleo de Plataforma Tecnológica do Instituto Aggeu Magalhães, utilizando o sistema de sequenciamento Illumina MiSeq Sequencing System MiSeq(Illumina, San Diego, CA, EUA). A construção da biblioteca de DNA foi realizada através do kit de preparação Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. O WGS foi realizado com o kit MiSeq V3-600 ciclos-, resultando em leituras de extremidade pareada 2 × 250, com um comprimento de leitura de 500 pb.

4.6 BIOINFORMÁTICA

A análise bioinformática foi inicialmente realizada no Instituto de Investigação do Medicamento (iMed. ULisboa) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e posteriormente transferida para o Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz. *Reads* obtidas através do sequenciamento das bibliotecas genômicas foram submetidas a um controle de qualidade com vista à remoção de adaptadores de sequenciamento e bases de qualidade reduzida (PHRED < 20/Q20), sendo retidas apenas reads com tamanho mínimo de 36 pb (Trimmomatic) (Bolger; Lohse; Usadel, 2014).

A totalidade das reads filtradas e obtidas no passo anterior foram mapeadas contra o genoma da cepa de referência MTB H37Rv (GenBank NC000962.3) utilizando o software Burrows-Wheeler Alignment Tool (BWA) e o algoritmo BWA-MEM (Li & Durbin, 2009). Variantes genômicas (*variant calling*) foram identificadas com o uso de pelo menos dois softwares: SAMTools e GATK, com remoção de sequências duplicadas (deduplicação) (Li et al., 2009).

Diversos conjuntos de variantes foram obtidos e, dependendo do objetivo, considerou-se o universo de variantes obtidas por cada isolado ou apenas as variantes concordantes entre os métodos utilizados. A identificação de variantes estruturais (>50 pb) foi realizada através do software DELLY2, considerando-se como variantes de elevada confiança aquelas suportadas pelos métodos analíticos de *split-read* e *paired-end*.

As variantes genômicas obtidas foram anotadas do ponto de vista funcional utilizando o software SnpEff, com integração de metadados disponíveis em diversas plataformas de acesso público (por exemplo, MycoBrowser/TubercuList). A determinação da (sub)linhagem de cada cepa foi realizada utilizando diversos *scripts in-house* (R/Bash) desenvolvidos, validados e empregados no iMed.Ulisboa. A determinação *in silico* do perfil de *spoligotyping* foi realizada utilizando os programas SpolPred e Spotyping (Xia; Teo; Ong, 2016; Coll et al., 2012).

4.7 PREDIÇÃO DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA A DROGAS E DETERMINAÇÃO DA LINHAGEM POR CLUSTERING

A predição de resistência baseada em dados gerados por WGS, assim como a determinação de *Clusters* para identificação das linhagens, foi objeto de estudo na plataforma TBProfiler na versão da *pipeline* 4.0.1 (Coll et al, 2015). A plataforma realiza a análise partindo da seleção da posição genômica analisada do genoma da cepa de referência MTB H37Rv através de uma estratégia de associação direta. A análise conclui que uma cepa é resistente a uma droga sempre que um marcador candidato a desenvolvimento de resistência é detectado.

Estas análises levaram a definição do tipo de resistência do MTB (Monorresistente, RR, MDR, polirresistente, e XDR), além de trazer uma ampla cobertura de mutações dentre as expressas fenotipicamente, e aquelas que podem trazer um fenótipo de resistência eventualmente.

A determinação de *clusters* efetuada sob dois pontos de corte de distância genética 6 e 12 SNPs (Walker et al. 2018). Esta análise também evidenciada pelo software TBProfiler possibilitou identificar as linhagens e sublinhagens das cepas estudadas, promovendo resultados de impacto clínico epidemiológico. Como base de dados de variantes genômicas utilizadas na análise de dados, utilizamos o banco de dados TBProfiler validado pela Organização Mundial da Saúde para os fármacos, genes e mutações (Tabela 4).

Tabela 4 - Catálogo da WHO com os Fármacos, Genes e Mutações utilizadas na análise dos dados de sequenciamento para predição de resistência genotípica as drogas anti-TB.

Droga	Gene	Mutação
AMK	<i>eis</i>	c.-14C>T
	<i>rrs</i>	n.1401A>G
CAP	<i>rrs</i>	n.1401A>G, n.1402C>T, n.1484G>T
	<i>tlyA</i>	p.N236K, p.L74P
EMB	<i>embA</i>	c.-12C>T
	<i>embB</i>	p.M306V, p.M306I, p.Q497R, p.D354A, p.G406A, p.Y319S, p.G406D, p.G406S, p.M306L, p.Q497K, p.D328Y, p.G406C, p.Y319C
ETO	<i>ethA</i>	c.112del,p.K37fs, p.R207G, p.M1R
	<i>fabG1</i>	c.-15C>T
INH	<i>fabG1</i>	c.-15C>T, p.L203L
	<i>katG</i>	p.S315T, p.S315N, p.W328L
KAN	<i>eis</i>	c.-14C>T, c.-12C>T, c.-10G>A, c.-37G>T, c.-8del
	<i>rrs</i>	n.1401A>G, n.1484G>T
LVX	<i>gyrA</i>	p.D94G, p.A90V, p.D94A, p.D94N, p.S91P, p.D94Y, p.D94H, p.G88C
LZD	<i>rplC</i>	p.C154R
MXF	<i>gyrA</i>	p.D94G, p.A90V, p.D94A, p.D94N, p.S91P, p.D94Y, p.D94H, p.G88C
	<i>gyrB</i>	p.E501D
PZA	<i>pncA</i>	p.H57D, c.-11A>G, p.Q10P, p.H51D, p.T76P, p.G97D, p.V7G, p.C14R, p.D49G, p.H57R, p.Q141P, p.L4S, p.I133T, p.H71Y, p.T135P, p.H51R, p.I31S, p.V139A, p.D8G, p.A146V, p.W68C, p.H71R, p.K96T, p.Q10R, p.Y103*, p.T47A, g.2288709delins, p.A134V, p.P54L, p.I6T, p.S59P, p.S67P, p.G97C, p.L151S, c.-11A>C, p.V7L, p.W68G, p.W68R, p.G97S, p.R154G, p.D12A, p.F94C, p.G132S, p.L172P, p.L85P, p.T160P, p.Y34D, c.-5del, p.F58L,

		p.L182S, c.391_394del,p.V130fs, p.G97R, p.H57Y, p.L120P, p.L27P, c.319del,p.F106fs, p.D49A, p.L85R, p.Q122*, p.V180F, p.D8N, p.P69L, p.T142M, p.A146T, p.I90S, p.M175V, p.Y103C, c.518_519insG,p.E173fs, p.L159R, p.P62L, p.V180G, p.A102P, p.D12G, p.G132A, p.H51Q, p.V155G, p.D63A, p.F94L, p.V125F, p.E127_V130del, c.392_393insG,p.V131fs, c.392_393insGG,p.V131fs, p.D129_G132del, p.A143G, p.C138R, p.D12E, p.G105V, p.H71P, p.L4W, p.M1T, p.Q141*, p.V128G, p.V130G, p.V139G, p.Y103H, g.2288775delins, p.G24D, p.K96E, p.S164P, p.T142A, p.T177P, c.465_466insT,p.V155fs, p.K96R, p.V7A, p.W119C
RIF	<i>rpoB</i>	p.S450L, p.D435V, p.H445Y, p.H445D, p.D435Y, p.S450W, p.L452P, p.H445L, p.L430P, p.H445R, p.V170F, p.I491F, p.H445N, p.Q432K, p.Q432P, p.S441L, p.Q432L, p.Q432_F433insF, p.L443_T444insD, p.S450F, p.D435F, p.H445C, p.H445S, p.S441Q
SM	<i>gid</i>	c.104del,p.L35fs, c.353del,p.R118fs, p.Q125*, p.G69D, p.A134E, p.P75R
	<i>rpsL</i>	p.K43R, p.K88R, p.K88M
	<i>rrs</i>	n.517C>T, n.514A>C, n.878G>A

Fonte: WHO, 2023b

Legenda: AMK: Amicacina; CAP: Capreomicina; EMB: Etambutol; ETO: Etionamida; INH: Isoniazida; KAM: Canamicina; LVX: Levofloxacina (Flouroquinolona); LZD: Linezolida; MXF: Moxifloxacina (Flouroquinolona); PZA: Pirazinamida; RIF: Rifanpicina; SM: Estreptomicina.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS CEPAS TUBERCULOSE DROGA RESISTENTE (TB-DR) DE ACORDO COM TESTE MGIT

No total, 30 cepas de TB-DR foram cedidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE), onde todas foram analisadas pelo TSD fenotípico MGIT 960. As cepas foram cultivadas em meios de cultivo sólido (LJ) e líquido (7H9) contra quatro fármacos: RIF, INH, EMB e SM, as quais apresentaram perfis de resistência diversos.

A tabela 5 apresenta os resultados dos perfis de resistência das cepas TB-DR analisados pelo TSD MGIT. Diferentes perfis de resistência foram identificados, incluindo monorresistente, polirreistente, MDR e RR. Neste teste não foi possível classificar cepas XDR devido ao fato dos fármacos de segunda linha não terem sido analisadas fenotipicamente.

O perfil de resistência mais prevalente foi o de TB-MDR, com 15 das 30 análises (50%) apresentando resistência fenotípica concomitante à rifampicina (RIF) e isoniazida (INH). Em seguida, destacaram-se os casos de monorresistência, que representaram um total de 10 cepas (33,3%), todas elas com resistência a um único medicamento, exceto a RIF. Os casos de polirresistência totalizaram 3 (10%). Por fim, houve resistência isolada à RIF em 2 amostras (6,67%), correspondendo às cepas R1956 e R1512 (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfil de resistência das cepas TB-DR do LACEN-PE de acordo com o método MGIT.

Meio de Cultivo	ID Cepa	Medicamentos				Tipo de cepa
		RIF	INH	EMB	SM	
Sólido LJ (13)	R87	S	R	S	S	Mono
	R377	R	R	R	S	MDR
	R489	R	R	S	S	MDR
	R835	R	R	S	S	MDR
	R919	S	R	S	S	Mono
	R970	S	R	S	R	Poli
	R1001	R	R	S	S	MDR
	R1057	S	R	S	S	Mono
	R1192	S	R	S	S	Mono
	R1267	R	R	S	S	MDR
	R1667	R	R	S	S	MDR
	R1916	S	S	S	R	Mono
	R1956	R	S	S	S	RR
	R2008	S	R	S	R	Poli
Líquido 7H9 (15)	R89	S	R	S	R	Poli
	R140	S	S	S	R	Mono
	R347	S	R	S	S	Mono
	R457	S	S	S	R	Mono
	R550	R	R	R	S	MDR
	R551	R	R	-	S	MDR
	R660	S	R	S	S	Mono
	R864	R	R	S	S	MDR
	R1512	R	S	S	S	RR
	R1576	R	R	R	R	MDR
	R1607	R	R	S	S	MDR
	R1641	R	R	S	S	MDR
	R2486	S	R	S	S	Mono
	R2530	R	R	S	S	MDR
	R563	R	R	S	S	MDR
	R1822	R	S	S	S	Mono

Fonte: O autor.

Legenda: S: Sensível; R: Resistente; MDR: Multirresistente; Mono: Monorresistente; Poli: Polirresistente; RR: Resistente à RIF.

5.2 DETECÇÃO DA PRESENÇA DO MTB E DE RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA PELO TRM XPERT MTB/RIF ULTRA

Para realizar uma análise comparativa com o teste de sensibilidade a drogas (TSD) MGIT, foi conduzida uma avaliação utilizando o teste rápido molecular (TRM) Xpert MTB/RIF Ultra. Todas as cepas incluídas no estudo foram processadas por essa metodologia. Entre as cepas analisadas, houve a detecção de MTB em 28, enquanto apenas duas não apresentaram detecção pela plataforma, obtendo resultado como "Undetected". Uma delas, a cepa R87 foi catalogada posteriormente como *M. kansasii*.

Em relação à resistência à RIF, conforme observado na Tabela 6, houve apenas duas discordâncias quando comparado ao teste fenotípico MGIT, correspondendo às cepas R1956 e R835. Isso resultou em uma taxa de sensibilidade de 93% do Xpert MTB/RIF na identificação da resistência genotípica. Ambas as cepas demonstraram resistência à RIF no teste fenotípico MGIT 960, mas foram sensíveis no teste molecular Xpert MTB/RIF.

Tabela 6 - Detecção da presença de DNA micobacteriano e perfil de resistência à RIF em amostras analisadas pelo Teste Rápido Molecular Xpert MTB/RIF Ultra.

ID Cepa	Detecção MTB	Resistência à rifampicina
R864	D	R
R919	D	S
R87	UD	--
R89	D	S
R347	D	S
R377	D	R
R835	D	S
R551	D	R
R563	D	R
R970	D	S
R1667	D	R
R660	D	S

R1822	D	R
R140	D	R
R550	D	R
R1001	D	R
R1916	D	S
R1192	D	S
R1267	D	R
R2008	D	S
R1512	D	R
R1607	D	R
R1956	D	S
R1576	D	R
R1641	D	R
R2486	UD	--
R2530	D	R
R457	D	S
R489	D	R
R1057	D	S

Fonte: O autor.

Legenda: S: Sensível; R: Resistente; D: MTB Detectado; UD: MTB Não detectado; S: Sensível à RIF; R: Resistente à RIF.

5.3 SEQUENCIAMENTO DE GENOMA COMPLETO (WGS) E MAPEAMENTO DE READS

Das 30 cepas de TB-DR analisadas pelo método fenotípico Bactec MGIT 960, 21 foram encaminhados para o WGS com o objetivo de analisar o perfil genotípico completo de resistência, sendo uma removida (R87) por se tratar de uma micobactéria não-tuberculosa (*M. kansasii*). A análise foi baseada no alinhamento genômico com a cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank NC000962.3).

A primeira métrica analisada, profundidade média de leitura, reflete o número médio de vezes que cada base do genoma foi sequenciada. Este é um indicador crucial da confiabilidade e qualidade dos dados de sequenciamento. Observa-se que a cepa R1001 e R489 apresentam as melhores profundidade média de leitura, com um valor superior a x15, indicando uma alta profundidade e confiabilidade dos dados de sequenciamento para esta cepa. Em contraste, a cepa R1356 apresenta uma profundidade média de 134.353.893.018.362, mas uma profundidade mediana de leitura de apenas 13, sugerindo uma variação significativa na distribuição das reads sequenciadas.

Já a profundidade mediana de leitura fornece uma visão da centralidade da distribuição da profundidade de leitura. Valores baixos, como o observado na cepa R1356 (13x), podem indicar problemas na consistência do sequenciamento, requerendo validação adicional dos dados. Além disso, observou-se uma elevada heterogeneidade no nível de mapeamento. Devido a esses problemas, a cepa R1356 foi removida dos nossos resultados.

A cobertura indica a porcentagem do genoma de referência coberta pelas reads sequenciadas, com a maioria das cepas apresentando valores superiores a 99%, garantindo uma representação abrangente do genoma. A porcentagem de heterogeneidade revela variação genética nas reads, com a cepa R835 apresentando valores extremamente altos, sugerindo alta variabilidade genética. Sugere-se que cepas com alta profundidade média e mediana, como R1001, têm dados de alta qualidade. A alta cobertura na maioria das cepas assegura uma boa representação do genoma de referência.

Os resultados do sequenciamento e do mapeamento das reads obtidos foram representativos. A Tabela 7 apresenta os resultados do WGS e mapeamento das reads para diversas cepas de TB-DR, destacando métricas chave como profundidade média de leitura, profundidade mediana de leitura, cobertura, e porcentagem de heterogeneidade.

Tabela 7 - Representação da qualidade dos dados de sequenciamento e mapeamento das reads de algumas das cepas TB-DR de Pernambuco comparado ao genoma do MTB (H37Rv).

ID Cepas	Profundidade Média de leitura	Mediana de Leitura	Cobertura do Genoma	Porcentagem de Heterogeneidade
R1001	15.002.900.372.551	152	99.412.225.902.478	0.65987549688
R1057	901.660.906.700.528	91	99.595.165.222.183	0.54158156491
R1192	113.289.311.020.203	114	99.541.999.836.285	0.64684819045
R1356	134.353.893.018.362	13	99.953.548.917.785	0.40684128248
R2008	964.173.851.650.425	97	99.423.979.427.837	0.35994797063
R377	120.374.429.743.387	121	99.563.909.669.356	0.43811180922
R489	8.921.302.416.191	90	99.745.403.507.091	0.52663260600
R835	655.331.994.166.163	63	99.158.184.442.701	139.886.318.033
R919	129.421.141.621.296	130	99.236.306.354.331	0.37771701695

Fonte: O autor

A análise foi realizada com base em dados do WGS, identificando mutações específicas associadas à resistência a várias drogas de primeira e segunda linha do tratamento, e categorizando as cepas em diferentes classes de resistência. Os fármacos analisados incluíram Amicacina (AMK), Capreomicina (CAP), EMB, Etionamida (ETO), Isoniazida (INH), Kanamicina (KAN), Levofloxacina (LVX), Linezolida (LZD), Moxifloxacina (MXF), PZA, RIF E SM. A resistência foi determinada pela detecção de mutações específicas em genes chave (Tabela 4), associados à resistência as drogas anti-TB mencionadas. Posteriormente, os resultados do sequenciamento de mapeamento de reads obtidos foram analisados pela plataforma TBProfiler.

Das 20 cepas analisadas, 50% (10/20) foram classificadas como resistentes a múltiplas drogas (MDR) pelo WGS, apresentando resistência à isoniazida (INH) e à rifampicina (RIF). Entre as amostras, identificamos uma cepa pré-XDR (R1667), que demonstrou resistência às fluoroquinolonas levofloxacina (LVX) e moxifloxacina (MXF), mas permaneceu sensível à linezolida (LZD). Além disso, a cepa R1001 foi classificada como XDR, destacando-se por sua resistência adicional a essas mesmas drogas, bem como a outras classes de medicamentos

A cepa R1001 foi assim classificada devido à resistência adicional a FQs (LVX e MXF), injetáveis (AMK e KAN) e a pelo menos uma droga nova, que no estudo, foi a LZD. É interessante notar a variedade de mutações nos casos de medicamentos como PZA e EMB que mostram que uma resistência pode advir de diferentes variantes (Tabela 8). Já a cepa de R1667 apresentou mutações correlatas à resistência por FQs, concluindo seu perfil genotípico.

Todos os tipos de mutações foram identificados como Variantes de Nucleotídeo Único (do inglês, *Single Nucleotide Variants* – SNVs), classificadas entre sinônima e não sinônimas, mais especificamente, SNPs. Outro dado relevante, é que a cepa R1001 (XDR) apresentou duas mutações pontuais que representaram resistência às duas FQs (H70R e A90V). Já na resistência à RIF, foi possível identificar mutações diferentes da mais frequente (H445Y e I491F) evidenciando a eficácia de uma análise genômica completa.

A predição de resistência genotípica das cepas de TB-DR no estado de Pernambuco, com base no WGS, revela uma alta prevalência de cepas TB-MDR, com algumas apresentando perfil de pré resistência extensiva e resistência extensiva propriamente dita (XDR). As mutações de alto impacto mais frequentes associadas ao perfil de resistência MDR incluem *rpoB* (S450L) e *katG* (S315T), com frequências de ocorrência de 10% e 17%, respectivamente.

É interessante destacar que as cepas R1192 e R1512 apresentaram um perfil de resistência genotípico divergente do fenotípico MGIT para a RIF e INH, respectivamente. A primeira com uma mutação no códon 491 do gene *rpoB*, substituindo uma isoleucina (I) por uma fenilalanina (F). Já a segunda apresentou uma mutação no códon 315 do gene *katG*, com uma substituição da serina por uma treonina. A Tabela 8 fornece uma análise detalhada da predição de resistência genotípica às drogas anti-TB das 21 cepas de TB-DR.

Tabela 8 - Predição da resistência genotípica as drogas anti-TB de cepas de MTB através da análise por (WGS).

Drogas (gene)	ID Cepas Mtb (Mutação)										
	377	489	919	1001	1057	1192	1667	2008	87	89	347
AMK (rrs)	S	S	S	R (1401A>G)	S	S	S	S	S	S	S
KAN (rrs)	S	S	S	R (1401A>G)	S	S	S	S	S	S	S
EMB (embB)	S	S	S	R (M306L)	S	S	R (Q497R)	S	S	S	S
ETO (fabG1)	S	R (-15C<T)	S	S	S	S	S	R (-15C>T)	S	S	S
INH (katG)	R (S315T)	R (S315T)	R (S315T)	R (S315T)	R (S315T)	R (S315T)	R (S315T)	R (S315T)	S	R (S315N)	R (S315T)
SM (rpsL)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LVX (gyrA)	S	S	S	R (H70R e A90V)	S	S	R (A90V)	S	S	S	S
MXF (gyrA)	S	S	S	R (H70R e A90V)	S	S	R (A90V)	S	S	S	S
PZA (pncA)	S	S	S	R (Q10R)	S	S	R (D12A)	S	S	S	S
LZD (rplC)	S	S	S	R (C154R)	S	S	S	S	S	S	S
RIF (rpoB)	R (H445Y)	R (S450L)	S	R (S450L)	S	R (I491F)	R (S450L)	S	S	S	S
CAP	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Tipo de Cepa	MDR	MDR	Mono	XDR	Mono	MDR	Pré-XDR	Mono	Sensív el	Mono	Mono

Drogas (gene)	ID Cepas Mtb (mutação)									
	551	563	835	864	1267	1512	1607	1822	1916	1956
AMK (rrs)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KAN (rrs)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EMB (embB)	S	S	S	R (G497R)	R (M306L)	S	R (M306I)	R (G497R)	S	S
ETO (fabG1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
INH (katG)	R (S315T)	R (S315T)	S	R (S315T)	R (S315T)	R (S315T)	R (S315T)	R (S315T)	S	S
SM (rpsL)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LVX (gyrA)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MXF (gyrA)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PZA (pncA)	R (M175T)	R (C72R)	S	R (-11>G)	R (T76P)	S	R (L128S)	R (Q10R)	S	S
LZD (rplC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RIF (rpoB)	R (S450L)	R (S450L)	S	R (S450L)	R (S450L)	R (S450L)	R (S450L)	R (S450L)	S	S
CAP	S	S	S	S	S	S	S	S		
Tipo de Cepa	MDR	MDR	Sensível	MDR	MDR	MDR	MDR	MDR	Sensível	Sensível

Fonte: O autor.

Legenda: S: Sensível; R: Resistente Drogas: AMK: Amicacina; CAP= Capreomicina; EMB: Etambutol; ETO= Etionamida; INH: Isoniazida; KAM: Canamicina; LVX: Levofloxacina (Flouroquinolona); LZD: Linezolida; MXF: Moxifloxacina (Flouroquinolona); PZA: Pirazinamida; RIF: Rifampicina; SM: Estrprtomocina. Resistência: MDR: Multirresistente; Mono: Monorresistente; Poli: Polirresistente; RR: Resistente à Rifampicina

5.4. ANÁLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES METODOLOGIAS NA DETECÇÃO DE TB-MDR

A análise da predição da resistência à RIF e INH das cepas MTB-DR provenientes de Pernambuco foi realizada utilizando inicialmente duas metodologias: o teste MGIT, conduzido pelo LACEN-PE, e o WGS, realizado no IAM-FIOCRUZ/PE em colaboração com a Universidade de Lisboa para as análises de bioinformática.

Para as análises de predição de resistência à INH, o resultado obtido através da metodologia MGIT mostrou que, dos 30 isolados testados, 25 (83,3%) foram classificados como resistentes (R) e 5 (16,6%) como sensíveis. No entanto, no teste de WGS, observou-se divergência nos resultados entre os testes fenotípico e genotípico em algumas cepas (R835, R1512 e R1956).

Houve divergências nos resultados para as cepas R835 e R1956 entre os testes fenotípico e genotípico. A cepa R835 apresentou sensibilidade à rifampicina (RIF) tanto no WGS quanto no Xpert MTB/RIF, e sensibilidade à isoniazida (INH) segundo o WGS. No entanto, o teste fenotípico indicou resistência a ambos os fármacos. Da mesma forma, a cepa R1956 mostrou sensibilidade à RIF nos testes genotípicos, mas o teste fenotípico detectou resistência. Em contrapartida, destaca-se o resultado da cepa R1512, que apresentou resistência no teste pelo WGS no gene *katG* (S315T) associado à resistência à INH, enquanto no teste fenotípico MGIT, ela se mostrou negativa para a resistência ao respectivo fármaco, mostrando o potencial preditivo da ferramenta WGS.

No caso da divergência das cepas com resultados de resistência à RIF (R835 e R1192), um dos dois marcadores de uma cepa TB-MDR, foi realizada outra metodologia como teste complementar para confirmar a resistência à RIF: o Xpert MTB-RIF, um teste rápido molecular atualmente endorsado pela WHO para a confirmação deste perfil de resistência. Na cepa R835, a técnica complementar mostrou sensibilidade à RIF, corroborando o resultado do WGS. No caso da R1192, identificou-se resistência à RIF apenas pelo WGS, indicando uma mutação não catalogada e não expressa fenotipicamente. A tabela 9 fornece uma comparação entre os resultados expostos pelos testes fenotípicos e genotípicos utilizados no estudo.

Tabela 9 - Resultados dos testes laboratoriais analisados para detecção da resistência à RIF e INH das cepas *Mtb*-DR (MGIT; Sequenciamento WGS e Xpert MTB-RIF).

ID Cepas	MGIT (INH)	WGS (INH)	MGIT (RIF)	WGS (RIF)	Xpert MTB (RIF)
R89	R	R	S	S	S
R140	S	--	S	--	S
R347	R	R	S	S	S
R377	R	R	R	R	R
R457	S	--	S	--	S
R489	R	R	R	R	R
R550	R	--	R	--	R
R551	R	R	R	R	R
R563	R	R	R	R	R
R660	R	--	S	--	S
R835	R	S	R	S	S
R864	R	R	R	R	R
R919	R	R	S	S	S
R970	R	--	S	--	S
R1001	R	R	R	R	R
R1057	R	R	S	S	S
R1267	R	R	R	R	R
R1192	R	R	S	R	S
R1512	S	R	R	R	R
R1576	R	--	R	--	R
R1607	R	R	R	R	R
R1641	R	--	R	--	R
R1667	R	R	R	R	R
R1822	R	R	R	R	R
R1916	S	S	S	S	S
R1956	R	S	R	S	S
R2008	R	R	S	S	S
R2486	R	--	S	--	R
R2530	R	--	R	--	R

Fonte: O autor

Legenda: S: Sensível; R: Resistente; INH: Isoniazida; RIF: Rifampicina; MGIT: Tubo indicador de crescimento de micobactérias; MIC: concentração inibitória mínima; WGS: sequenciamento de genoma completo.

Acerca dos resultados do WGS para o fármaco EMB, vemos uma discrepância entre a análise da expressão fenotípica de resistência (MGIT) e a predição genotípica (WGS) entre algumas cepas. Os isolados R864, R1001, R1267, R1607, R1667, e R1822 se mostraram genotipicamente resistentes frente à análise do WGS, enquanto no teste fenotípico, todas se mostraram sensíveis, evidenciando um claro potencial preditivo da análise genotípica de resistência para esta droga.

No teste de identificação de resistências a drogas de primeira linha, 18 das 20 cepas analisadas tanto pelo WGS quanto pelo MGIT apresentaram concordância nos resultados para a resistência à isoniazida (INH), resultando em uma taxa de 90%. A mesma taxa de concordância foi observada para a rifampicina (RIF). Em relação ao etambutol (EMB), foi identificada a menor taxa de concordância, com 70% (16/20). Para a estreptomicina (SM), a taxa de concordância entre os testes foi de 85% (17/20).

Das 20 cepas que foram submetidas à análise do WGS, ao todo, segundo os resultados da metodologia, 3 isolados foram identificados com susceptíveis, 4 foram caracterizados como monorresistente, 10 como MDR, 1 como polirresistente, além de 1 como pré-XDR e 1 como XDR. Já na análise do MGIT, nenhum isolado foi caracterizado como susceptível, 6 apresentaram monorresistência, 2 cepas foi classificada como RR, 2 como polirresistente, 11 foram classificados como MDR, e nenhuma classificada como pré-XDR ou XDR (Tabela 10).

Tabela 10 - Perfis de resistência das cepas quanto às análises fenotípica (MGIT) e genotípica (WGS).

ID Cepas	Perfil de Resistência	
	WGS	MGIT
R89	Monorresistente	Polirresistente
R347	Monorresistente	Monorresistente
R377	MDR	MDR
R489	MDR	MDR
R551	MDR	MDR
R563	MDR	MDR
R835	Susceptível	MDR
R864	MDR	MDR
R919	Monorresistente	Monorresistente
R1001	XDR	MDR
R1057	Monorresistente	Monorresistente
R1192	MDR	Monorresistente
R1267	MDR	MDR
R1512	MDR	RR
R1607	MDR	MDR
R1667	Pré-XDR	MDR
R1822	MDR	MDR
R1916	Susceptível	Monorresistente
R1956	Susceptível	RR
R2008	Polirresistente	Polirresistente

Fonte: O autor.

Legenda: MDR: Multidroga resistente; RR: Rifampicina resistente; pré-XDR: Pré extensivamente resistente; XDR: Extensivamente resistente

5.5 ANÁLISE DE CLUSTERS E DETERMINAÇÃO DAS LINHAGENS FILOGENÉTICAS DAS CEPAS DE DR-MTB

A análise das linhagens filogenéticas do MTB é essencial para compreender a disseminação e a evolução das cepas resistentes a drogas. No estudo em questão, foram identificadas várias linhagens de MTB, todas pertencentes à família Euro-Americana, com exceção da cepa R87, a qual foi identificada como *M. kansasii*. Os resultados do estudo demonstram a linhagem filogenética 4 das cepas analisadas, classificadas como Euro-Americanas. Essa família inclui várias sub-linhagens, indicando uma diversidade genética. É notável a predominância da sublinhagem 4.1.1.1 entre as cepas analisadas: R347, R377, R551, R864, R1267 e R1822.

A Tabela 11 apresenta os resultados da caracterização filogenética das cepas de TB-DR submetidas à análise por WGS. No total, foram encontradas nove cepas pertencentes à sublinhagem 4.1 e sete à sublinhagem 4.3, mostrando uma predominância. Apenas os isolados R563 e R1956 se desviam dessas frequências, pertencendo às sublinhagens 4.8 e 4.7, respectivamente.

Tabela 11 - Linhagem filogenética de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* analisadas no estudo.

ID	Linhagem Filogenética	Família
R89	4.1.2.1	Euro-American
R347	4.1.1.1	Euro-American
R377	4.1.1.1	Euro-American
R489	4.3.3	Euro-American
R551	4.1.1.1	Euro-American
R563	4.8	Euro-American
R835	4.1.2.1	Euro-American
R864	4.1.1.1	Euro-American
R919	4.3.3	Euro-American
R1001	4.3.4.2	Euro-American
R1057	4.3.4.1	Euro-American
R1192	4.3.4.2	Euro-American
R1267	4.1.1.1	Euro-American
R1512	4.1.2.1	Euro-American
R1607	4.3.2	Euro-American
R1667	4.3.4.2	Euro-American
R1822	4.1.1.1	Euro-American
R1916	4.4.1.1	Euro-American
R1956	4.7	Euro-American
R2008	4.1.2.1	Euro-American

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

Embora tenha havido uma recuperação global no número de pessoas diagnosticadas com TB desde 2022, após dois anos de interrupções associadas à COVID-19, a TB continua a ser a segunda maior causa de morte no mundo por um único agente infeccioso (WHO, 2023). No Brasil, dados preliminares do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde registraram 80.012 novos casos da doença em 2023, ressaltando a necessidade contínua de investimentos no combate à TB (Brasil, 2024).

A TB multidroga resistente (TB-MDR) é uma ameaça permanente para o controle da doença, uma vez que a incidência destes casos é recorrente em todo o mundo, e no ano de 2024 somou 70% dos casos no Brasil, seguido pelo perfil de monorresistência (25%) e polirresistência (4,5%) o que corrobora com nossos achados predominantes deste padrão de resistência (WHO, 2023; Brasil, 2024). Isso se dá majoritariamente ao longo do tratamento, que envolve fármacos de alta toxicidade, e repleto de reações adversas, muitas vezes severas e irreversíveis (Cohen et al., 2019). Estes ônus muitas vezes reduzem a adesão ao tratamento, diminuindo a taxa de cura, e resultando na amplificação da resistência (Coll et al., 2015).

Nas últimas décadas, a pesquisa e as práticas de saúde pública, incluindo a investigação de contatos e métodos fenotípicos para testes de suscetibilidade a drogas (TSD), foram complementadas por abordagens moleculares. Essas abordagens agora podem fornecer diagnóstico rápido, perfil de suscetibilidade a drogas e uma compreensão das dinâmicas de transmissão do *M. tuberculosis* (Meehan et al., 2019; CRyPTIC, 2022).

Embora existam diversos métodos de diagnósticos moleculares disponíveis atualmente, os testes atuais se concentram em regiões genéticas específicas, abandonando algumas variações genéticas, e limitando a detecção de resistência a um número restrito de drogas. Sendo assim, estratégias integradas são necessárias para solucionar casos de resistência mais complexos (Cabibbe et al., 2018).

Nesse estudo, utilizou-se o WGS por ser uma metodologia de amplo espectro de cobertura, que se destaca por ser preciso e minucioso na cobertura de identificação de mutações de resistência. A literatura mostra que o método é ideal para organismos com pequenos genomas, baixa taxa de mutação e vetores integrativos como é o caso do MTB, além de detectar pequenas mutações, muitas vezes imperceptíveis a outras metodologias (Cole et al., 1998; Cabibbe et al., 2018; Meehan et al., 2019). Um forte exemplo pode ser visto no estudo de Sun e colaboradores (2022), que, através do WGS de cepas de TB-MDR, identificaram um isolado resistente à Pirazinamida, que era devido à uma pequena deleção de 140pb no fim da posição 3' do gene *katG*.

Pode ser observado que para uma definição correta do perfil de resistência, seja necessário realizar confirmações por meio de testes fenotípicos e genotípicos. Em seu estudo, Sun e colaboradores (2022) utilizaram o WGS como método genotípico para comparar com o MGIT, um método fenotípico, a resistência à fármacos de primeira e segunda linha, concluindo que há uma alta taxa de consistência (+90%) entre os testes.

Baseado nos estudos de Yu et al. (2023), o MGIT pode ser utilizado como um excelente teste complementar, pois reduz significativamente o tempo de obtenção de resultados, sendo uma boa opção para o diagnóstico de resistência a fármacos anti-TB de primeira linha, fornecendo uma visão fenotípica do diagnóstico de resistência. Apesar de apresentar resultados significativos de concordância com outros testes, conforme demonstrado pelo nosso estudo, a utilização do MGIT como ferramenta de detecção e predição possui limitações. Ele é capaz apenas de identificar fenotipicamente a expressão de resistência, sem alcançar o nível molecular necessário para prever um quadro de resistência genotípica e, posteriormente, fenotípica (Acharya et al., 2020).

Essas limitações podem ocorrer devido à vários fatores. De maneira simples, pode se dever a concentrações críticas predefinidas do método, que podem não detectar a concentração inibitória mínima do fármaco frente a cepas resistentes, além de não identificar algumas mutações determinantes de resistência, inclusive para medicamentos de primeira linha (Sun et al., 2022).

Outro motivo deve-se ao fato de que algumas mutações que conferem resistência podem acarretar um custo de *fitness* para a bactéria. Isso significa que, embora a mutação permita que a bactéria sobreviva à presença de um antibiótico, ela pode comprometer outras funções, como crescimento ou virulência. Como resultado, a bactéria pode não se proliferar ou se tornar dominante na população, levando à ausência de expressão fenotípica observável (Nimmo et al., 2022).

O custo de *fitness* pelas mutações causadas no gene *rpoB* pode ser revertido por mutações compensatórias, especificamente mutações em *rpoA* e *rpoC* que codificam duas outras subunidades da enzima RNA polimerase (alfa e beta prime). Estas características foram identificadas em experimentos de cultura *in vitro* e, adicionalmente, são observados em uma prevalência aumentada em países com alta carga de TB-MDR como o Brasil (Comas et al., 2011; Nimmo et al., 2022). Nossas análises revelam uma concordância com este resultado através da cepa R1192 (MDR). Mediante análise do WGS, foi descoberta uma mutação incomum (p.L491F) no gene *rpoB*, uma análise mais aprofundada do sequenciamento foi realizada, onde identificamos duas mutações no gene *rpoC*: (p.V431M,p.A542A), provavelmente compensatórias.

Em concordância com as hipóteses mencionadas, casos semelhantes foram observados no presente estudo. As cepas R1512 e R1192 demonstraram resultados discordantes entre os testes fenotípico e moleculares. A cepa R1512 apresentou resistência à INH, conforme confirmado pelo WGS, enquanto o teste MGIT indicou sensibilidade. De forma semelhante, a cepa R1192 exibiu resistência à RIF na análise do WGS, mas não nos testes Xpert MTB/RIF e no MGIT. Esses resultados indicam que ambas as cepas, inicialmente classificadas como monorresistente (R1192) e sensível à RIF (R1512) pelos testes fenotípicos, possuem mutações que as reclassificam como MDR, de acordo com os dados do WGS.

Sendo assim, discordâncias entre o teste fenotípico e o WGS foram observadas na comparação dos nossos resultados. De maneira semelhante ao estudo de Sun e colaboradores (2022), que destacou limitações ao comparar os métodos de WGS e MGIT, identificamos inconsistências entre esses dois métodos. A menor concordância observada por Sun et al. (88,89%) ocorreu nos isolados resistentes ao EMB Apesar de também ser o fármaco com menor concordância entre o resultado do MGIT e o WGS, nossa análise apresentou uma sensibilidade ainda menor do MGIT (70%).

No presente estudo, seis das 21 cepas apresentaram divergências entre os resultados dos mesmos testes: essas cepas mostraram resistência ao EMB na análise genômica, mas exibiram um perfil de suscetibilidade ao mesmo fármaco no teste MGIT. Esses achados reforçam a capacidade do WGS de prever a resistência, destacando seu valor como ferramenta complementar no diagnóstico e tratamento da tuberculose.

No nosso estudo, as cepas apresentaram mutações nos genes *embA* (1 isolado) e *embB* (7 isolados). Essa situação pode se agravar quando o nível de resistência está associado à concentração inibitória mínima (Sun et al., 2022). A discordância entre os resultados dos testes deve-se a grande variedade da detecção de mutações de resistência ao EMB pela metodologia do WGS. Das 14 mutações catalogadas pela WHO, 5 diferentes tipos foram encontrados em nosso estudo (-12C>T, M306L, Q497R, G497R, M306I) (WHO, 2023b). Por terem sido identificadas ainda como mutações que podem conferir ou não resistência fenotípica, as cepas R864, R1001, R1267, R1607, R1667 e R1822, se mostraram sensíveis no teste MGIT, porém apresentaram resistência genotípica na análise do WGS.

O WGS como ferramenta de predição para drogas de primeira e segunda linha se mostrou fortemente eficiente, principalmente para as drogas de primeira linha (INH e RIF) que caracterizam uma cepa de TB como MDR caso apresente resistência à ambas, demonstrado pelo presente estudo, e suportado pelos resultados de Wang e colaboradores (2022). Os autores realizaram uma análise de 97 isolados de um hospital da França previamente caracterizadas como MDR, XDR e pansuscetível pela análise fenotípica MGIT.

Por outro lado, é notável a necessidade de melhorias na sensibilidade da análise para outras drogas de primeira e segunda linha (WANG et al., 2022). Em análises de WGS para a predição de resistência da TB a drogas de primeira linha feitas por Schleusener e colaboradores (2017) e Kohl e colaboradores (2018) (91, 54, respectivamente), a sensibilidade do software TBProfiler para predição de resistência da SM foi de 57%. No nosso estudo, nenhuma das 4 cepas tratadas fenotipicamente como resistentes pela SM foram identificadas pelo WGS.

Dado o contexto, observa-se uma vantagem na utilização de métodos genotípicos como o WGS de forma complementar aos fenotípicos, tanto para a rápida definição do perfil de resistência a drogas quanto para a confirmação e compatibilidade dos dados genotípicos e fenotípicos de resistência. Uma das aplicações promissoras é a identificação da resistência à PZA. Os resultados obtidos através de métodos baseados em cultura como o MGIT têm uma menor confiabilidade, pois requerem um pH atipicamente alto, fazendo-se necessário a realização de métodos confirmatórios, sendo o WGS fortemente promissor (WHO, 2021; Sun et al., 2022). Ademais, uma análise epidemiológica molecular realizada em múltiplos países evidenciou a associação entre a resistência à PZA e RIF, confirmando o papel da predição à resistência à PZA na TB-MDR. No nosso estudo, 6 cepas preditas como TB-MDR (4), pré-TB-XDR (1) e TB-XDR (1).

A abordagem simplificada de caracterização da resistência fenotípica, que oferece a mesma conduta a todos os pacientes acometidos por TB-MDR, torna o uso isolado do teste fenotípico MGIT relativamente inadequado aos princípios do plano End-TB proposto pela WHO. Esse plano visa um diagnóstico preciso e rápido, além de uma prevenção de alta qualidade. No entanto, o MGIT não atende plenamente a esses objetivos, especialmente porque não consegue prever com precisão o desfecho do tratamento dos pacientes (WHO, 2023).

Gradualmente, tem-se aceitado que a introdução de múltiplos testes de sensibilidade a drogas (TSDs) pode ser um fator-chave para guiar um tratamento adequado, melhorar os desfechos dos casos de resistência e até mesmo evitá-los. Este objetivo pode ser alcançado com a associação de testes genotípicos, como o Xpert MTB/RIF Ultra, e a implementação do WGS, devido à sua capacidade de predição de resistência (Sun et al., 2020). Neste estudo foi possível observar que embora não muito frequente, é possível a ocorrência de resultados divergentes, o que pode resultar numa conduta medicamentosa errada tanto para os pacientes acometidos pela TB-DR quanto pela TB sensível a medicamentos.

Há uma crescente evidência, fomentada por estudos mais recentes, de que o teste de sensibilidade a drogas genotípico poderia substituir o teste fenotípico (HE et al., 2020). O WGS é um forte candidato a essa substituição, dada sua capacidade de identificar mutações, prever resistência genotípica e ser mais eficiente do que os testes fenotípicos (Meehan et al., 2019; He et al., 2020). No entanto, devido à clara complementariedade das abordagens destacadas em estudos comparativos e no presente estudo, é evidente que a proposta de associação das duas metodologias recomendada pela WHO proporciona os melhores resultados (Natarajan et al., 2020; WHO, 2023).

Nesse estudo, utilizamos outro método genotípico endossado pela WHO e amplamente utilizado como teste inicial de pacientes no Brasil, e no mundo, o Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, EUA) (WHO, 2023; Brasil, 2024). Esse ensaio baseado em reação da cadeia da polimerase nested com multiplex em tempo real que tem como alvo as sequências de inserção IS6110 e IS1081 para detecção do MTB. Já o gene *rpoB*, é alvo para detecção de mutações na região determinante de resistência à RIF (RDRR) de 81 pb, responsáveis por aproximadamente 95% dos casos de Resistência à RIF (Chakravorty et al., 2017).

Comparado com seu antecessor, o Xpert MTB/RIF Ultra teve um forte ganho em sua sensibilidade frente à menores concentrações de MTB (116 vs 13 unidades formadoras de colônias por mL) (Chakravorty et al., 2017). Embora tenha uma notável sucessão quanto à versão anterior, o Xpert MTB/RIF Ultra ainda se torna limitado por restringir a detecção da resistência apenas à RIF e a poucas regiões específicas do genoma.

Esta premissa é claramente vista no caso de ocorrências de mutações incomuns que conferem resistência à RIF. O estudo de Rigouts e colaboradores (2023) testou 28 isolados de MTB com diferentes mutações no gene *rpoB* frente à análise do Xpert MTB/RIF Ultra. Entre os isolados testados, 8 mutantes associados à resistência foram classificados como "Resistência indeterminada" e 1 como "Resistência não identificada" pelo Xpert MTB/RIF Ultra.

Já o estudo observacional de Makhado e colaboradores (2018) elucidou que a mutação Ile491Phe (I491F), uma das mutações incomuns associadas à resistência à RIF, foi identificada corretamente em apenas 37 de 249 cepas de MTB com essa mutação em testes moleculares endossados pela WHO Xpert MTB/RIF, GenoType MTBDRplus, and BACTEC MGIT 960. A análise vai de acordo com nossos achados a partir do resultado da análise comparativa da cepa R1192, que apresenta resistência à RIF associada à mutação incomum Ile491Phe no gene *rpoB*, não detectada pelo teste molecular Xpert MTB/RIF nem pelo teste fenotípico MGIT, todavia corretamente identificada pelo WGS. Pacientes com esta mutação foram correlacionados com maior mortalidade (Makhado et al., 2018).

A identificação dessa mutação e outras não tão comuns se torna relevante, uma vez que está comumente associada a cepas de TB-MDR, conforme demonstrado pela revisão sistemática de Hazra e colaboradores (2023), em concordância com nossos resultados. Além disso, o mesmo estudo concluiu que essa mutação específica está associada a alta mortalidade dos pacientes, o que pode conferir uma vantagem seletiva a essa variante. Isso ressalta a necessidade clínica e epidemiológica de uma detecção e predição corretas de mutações incomuns associadas à emergência da TB-MDR.

Xie e colaboradores (2024), em um estudo comparativo entre o teste fenotípico MGIT e o Xpert MTB/RIF Ultra para detecção do MTB, demonstraram que não houve diferença significativa na sensibilidade entre os dois métodos para esse propósito. No entanto, outro estudo relatou uma taxa de sensibilidade de 88% para a detecção do bacilo, onde, das 462 amostras de escarro testadas positivamente na baciloscopia, 408 (88%) detectaram corretamente a presença do MTB.

Nossos resultados demonstraram uma sensibilidade de 96%, onde apenas uma cepa (R2486) das trinta não foi identificada pelo teste, e a cepa R87 não é da espécie MTB. Esses achados sugerem que, embora raras, essas ocorrências reforçam a importância do uso de múltiplos testes para maior segurança na detecção do MTB e de resistência a drogas associadas à ele. Idealmente, deve-se combinar um teste fenotípico com um genotípico de rápido resultado, como o Xpert MTB/RIF Ultra ou o WGS, para garantir a precisão na identificação e resistência do patógeno.

No estudo de Dorman e colaboradores (2018), 369 das 376 amostras testadas como resistentes à RIF pelo teste fenotípico MGIT foram corretamente detectadas pelo Xpert MTB/RIF Ultra. A taxa de proporção de detecção genotípica apresentada por esse estudo é parcialmente compatível com a proporção encontrada no presente estudo, sendo de 1:1,02 nos resultados da literatura, comparado com 1:1,07 em nossos resultados. Contudo, para resultados mais robustos, recomenda-se a análise com um contingente amostral maior.

A detecção de isolados como resistentes à RIF pelo MGIT, discordantes ao resultado genotípico em ambos os testes, como no caso das cepas R835 e R1956. Um dos motivos pode se dever a incompletude do entendimento e catalogação das bases genéticas dos mecanismos de resistência associados ao MTB (Miotto et al., 2018). Este é um dos grandes desafios associados à implementação do WGS como ferramenta de diagnóstico da infecção por MTB e predição de resistência na rotina clínica (IKETLENG et al., 2018).

Outra possível explicação para a divergência entre os resultados de resistência fenotípica e genotípica frente à RIF e INH na cepa R835 é a heterogeneidade populacional, conforme evidenciado pelos dados de qualidade da análise do WGS. Essa heterogeneidade pode justificar as discrepâncias observadas, embora sejam necessárias análises estatísticas mais aprofundadas e a repetição dos testes para confirmar esses achados (Nimmo et al., 2022).

Uma meta-análise conduzida por Ye e colaboradores (2021) demonstrou que populações heterogêneas quanto à resistência, mesmo quando consideradas monoclonais, são corretamente detectadas pelo teste fenotípico. Os autores também associaram essa heterogeneidade com piores desfechos de tratamento. Em nossa análise, observamos um cenário semelhante na cepa R1512, que apresentou sensibilidade à INH no teste MGIT, mas resistência no WGS, apesar de portar a mutação S315T, comum em cepas resistentes. Esses achados ressaltam a complexidade da resistência no MTB e a importância de utilizar múltiplos métodos para uma avaliação mais precisa.

Uma das maiores limitações do uso do WGS na prática clínica deve-se ao fato de que as bibliotecas atuais dessas mutações de resistência caracterizadas provavelmente não incluem todas as mutações potencialmente associadas aos fenótipos de resistência do MTB (Iketleng et al., 2018). Os dados que vinculam resistência genotípica e fenotípica são relativamente completos para alguns medicamentos de primeira linha, como RIF e INH, mas ainda estão incompletos, especialmente para novos medicamentos, o que pode justificar a diferença dos resultados encontrados nas cepas que apresentaram resistência fenotípica, mas susceptibilidade genotípica nas drogas de primeira linha.

Em uma grande análise de mais de 10.000 isolados dos seis continentes, a resistência fenotípica identificada pelo MGIT960 aos fármacos de primeira linha RIF, INH, EMB e PZA foi predita pelo método com sensibilidades variando de 91,3% a 97,5%, e a suscetibilidade foi predita com especificidades variando de 93,6% a 99%. Na análise específica dos isolados com suscetibilidade fenotípica definida a todos os quatro medicamentos de primeira linha, o WGS previu corretamente a suscetibilidade em 97,9% (CRyPTIC et al., 2018). Dado o N amostral de grande porte, proporcionalmente, as taxas tendem a aumentar, devido à boa capacidade do WGS de identificar previamente de forma precisa as mutações associadas à resistência.

Embora as mutações predisponentes de resistência tenham se mostrado bons preditores de fenótipos resistentes neste estudo, algumas cepas foram associadas a perfis de resistência inesperados em uma minoria de casos, destacando que é possível que haja discordâncias geno-fenotípicas que ainda precisam ser resolvidas. Entretanto, nosso estudo não realizou análises fenotípicas para os medicamentos de segunda linha o que pode ter impactado nestes resultados.

Acerca da viabilidade financeira do uso do WGS como ferramenta de predição de diagnóstico, ainda enfrentamos limitações relativas em países em desenvolvimento com alta prevalência de TB como o Brasil, pela necessidade de estrutura laboratorial e analistas de bioinformática especializados (Sun et al., 2022).

O estudo de Genestet et al. (2020) analisou 279 isolados de MTB de pacientes na França, um país com baixa carga de TB, e comparou os resultados com o teste fenotípico MGIT. Os pesquisadores destacaram a eficácia do WGS na predição do perfil de resistência, recomendando-o como ferramenta inicial na prática clínica, com sensibilidades de 100% para RIF, INH, EMB e 93,8% para PZA. Essa premissa traz a necessidade de que novas estratégias para redução do custo e aplicabilidade desta metodologia sejam necessárias para que os países com maior acometimento da TB e TB-MDR, como o Brasil, sejam contemplados com um diagnóstico de alta precisão.

Em incentivo ao desenvolvimento tecnológico, o estudo de He e colaboradores (2020) calculou o custo da análise do perfil de resistência utilizando WGS, trazendo-o como uma abordagem de maior custo-benefício. Foi calculada uma média de 60 dólares por análise de WGS, comparado com 90 dólares para a análise completa (incluindo drogas de segunda linha) realizada através de meio de cultura líquido. Entretanto, esta foi uma perspectiva laboratorial, se fazendo necessário o estudo de custo-benefício à nível de utilização na população geral.

Acerca da identificação e catalogação de novas mutações de resistência, o WGS desempenha um papel extremamente importante, porém necessita de cautela. A principal limitação do WGS é a dificuldade em prever o fenótipo de resistência para variantes genéticas raras ou novas, especialmente em medicamentos novos ou reutilizados (Meehan et al., 2019). Além disso, é importante catalogar variantes "benignas" e desenvolver novas abordagens estatísticas para diferenciar variantes causais de variantes neutras (Meehan et al., 2019). Neste estudo apenas identificamos mutações "malignas", mas algumas mutações neutras também foram identificadas, como algumas mutações compensatórias.

Embora existam limitações, os resultados da análise de predição de resistência pelo WGS dispostos no presente estudo corroboram com os achados de Sun e colaboradores (2022), que concluem que o resultado do perfil de resistência mais fidedigno parte da associação do teste de sensibilidade a drogas (TSD) fenotípico com o NGS. Esta associação permite a identificação de mutações não catalogadas ou incomuns, e a validação dos resultados de ambos os testes provendo assim resultados precisos e um tratamento mais efetivo, baseado na predição e identificação da resistência (Meehan et al., 2019; Sun et al., 2022).

A variedade dos resultados apresentados, entre os perfis de resistência deste estudo mostram o potencial de associação das metodologias, sendo também de acordo com o que é recomendado pela WHO (Natarajan et al., 2020; WHO, 2023).

Além da determinação do perfil de resistência para drogas anti-TB de primeira linha, a ferramenta WGS tem uma forte vantagem perante as outras analisadas pelo fato de realizar a cobertura de todas as mutações catalogadas nos genomas sequenciados (Cabbibe et al., 2018; Hazra et al., 2023). Nosso estudo mostrou que perfis de resistência traçados por metodologias fenotípicas como o MGIT podem definir precisamente o tipo de resistência da cepa, contudo não é capaz de prever um quadro de resistência.

Os resultados comparativos das 20 cepas analisadas demonstram que a análise genômica realizada pelo WGS foi capaz de identificar 80% dos perfis de resistência fenotípicos estabelecidos pelo MGIT. Entre essas cepas, duas foram classificadas pelo WGS como resistentes a múltiplas drogas (TB-MDR), divergindo dos perfis fenotípicos identificados pelo MGIT. A cepa R1192, que o MGIT apontou como monorresistente, foi prevista como TB-MDR pelo WGS, enquanto a cepa R1512, classificada como resistente à rifampicina (TB-RR) no MGIT, também foi considerada TB-MDR pela análise genômica. Devido à falta de análise fenotípica para a PZA, algumas cepas (R864, R1267, R1607, R1667, R1822) acabou gerando diferentes tipos de perfis de resistência comparando os resultados dois testes.

Ao analisar exclusivamente as cepas de TB-MDR, obtivemos uma concordância de 10 entre as 13 classificadas como TB-MDR na totalidade dos resultados dos dois métodos. 10 cepas foram classificadas como MDR pelo WGS e 11 pelo MGIT. Ao comparar o perfil de resistência catalogados por ambos os testes, encontramos que duas das 11 cepas (R1001 e R1667) traçadas como MDR pelo MGIT foram catalogadas como TB-pré-XDR e TB-XDR, e duas (R1192 e R1512) foram identificadas como TB=MDR pelo teste genotípico, enquanto demonstravam monorresistência no teste fenotípico.

Com estes dados, chegamos à conclusão de que, obtivemos 91% (11/12) de correta identificação genotípica dos perfis TB-MDR fenotípica, um pouco maior que os resultados encontrados por Wang e colaboradores (2022), que realizaram uma análise semelhante em 105 cepas da Rússia e China, utilizando os mesmos métodos de identificação de resistência (WGS e MGIT), utilizando o resultado fenotípico como referência, onde o WGS previu 82% das resistências fenotípicas.

Entretanto pelo fato de o MGIT não ter coberto as mesmas drogas analisadas pelo WGS, foi feita uma relação de concordância entre as drogas analisadas, principalmente as que são categorizadas pela WHO como marcadores de TB-MDR, a INH e a RIF (WHO, 2023). Todavia, nossos achados são de grande valia, uma vez que metodologias de diagnóstico de resistência podem conferir diferentes resultados, reforçando a necessidade de complementariedade dos métodos diagnósticos (Sun et al., 2022; Hazra et al., 2023).

Os resultados obtidos mostram uma alta concordância para a INH e a RIF (90%), o que reflete a eficácia dos testes WGS e MGIT para essas drogas. No entanto, a menor taxa de concordância foi observada para o EMB (70%), onde o WGS foi capaz de identificar 6 isolados genotipicamente resistentes, enquanto o fenótipo revelou suscetibilidade. Em contrapartida, a análise genotípica não identificou corretamente 4 cepas fenotipicamente resistentes à SM, o que nos traz uma concordância de 85%.

Comparando com o estudo de Wang et al. (2022), que analisou um maior número de amostras (97), e encontraram taxas levemente inferiores para a RIF (79,7%) e para a INH (86,3%), e superiores para o EMB (76,4%) e para a SM (88,37%). Essas variações podem ser atribuídas ao tamanho amostral e a possíveis diferenças metodológicas entre os estudos.

É relevante destacar a capacidade do WGS de identificar mutações relacionadas à resistência a novas drogas, como bedaquilina (BDQ) e linezolida (LZD). Softwares como o TBProfiler utilizam bancos de dados continuamente atualizados com novas mutações, como o catálogo da WHO utilizado neste estudo (Acharya et al., 2020; He et al., 2024). Por exemplo, nossas análises de genoma completo identificaram uma cepa resistente classificada como XDR, identificada como MDR pelo teste fenotípico (R1001), apresentando uma mutação no gene *rpIC*.

Estudos cristalográficos revelaram que mutações no gene *rpIC* podem diminuir a ligação da linezolida à subunidade ribossômica 50S ao alterar a estrutura do sítio de ligação adjacente da linezolida (Pi et al., 2019). Por se tratar de um fármaco recentemente descoberto, o conhecimento insuficiente dos mecanismos de resistência ao fármaco dificulta o diagnóstico molecular da resistência à linezolida (Pi et al., 2019). Dessa forma, destaca-se a importância da realização do WGS em cepas de TB em todos os níveis de resistência medicamentosa, em prol do incremento das bases de dados com mutações não catalogadas, potencialmente causadoras de resistência.

A utilização do WGS (sequenciamento de genoma completo) vai além da identificação e predição de resistência em cepas de TB-MDR, permitindo a detecção de todas as mutações catalogadas que conferem resistência a medicamentos no genoma dos bacilos. Por exemplo, é possível prever o nível de resistência simultaneamente a diversos medicamentos (Hazra et al., 2023). Isso é ilustrado pelos resultados do perfil de resistência da cepa R1001, que apresenta mutações na região determinante de resistência às quinolonas da enzima DNA girase. As mutações nas subunidades A (codificadas pelo gene *gyrA*) e B (codificadas pelo gene *gyrB*) estão associadas a alta resistência às fluoroquinolonas. Portanto, a predição dessas mutações antes da expressão fenotípica é um fator crucial para o desfecho do tratamento do paciente (KOLESKE; JACOBS; BISHAI, 2023; Hazra et al., 2023).

Cerca de 10% dos isolados de TB-MDR apresentam resistência às fluoroquinolonas (FQs) ou medicamentos injetáveis de segunda linha (aminoglicosídeos/polipeptídeos cíclicos), referidos como extensivamente resistentes a medicamentos anti-TB (TB-XDR), que desafia o manejo clínico (Katale et al., 2020). No nosso estudo, 16.6% (2/12) das estirpes identificadas como MDR por ambos os testes apresentaram resistência à pelo menos um dos medicamentos de segunda linha na análise genotípica, sendo duas destas confirmadas como pré-XDR ou XDR pelo WGS.

Acerca da resistência à aminoglicosídeos, especialmente, as cepas R1001 e R1667 possuem uma mutação no gene *rrs* n.1401A>G. Essa foi associada à altos níveis de resistência à canamicina (KAN) e maior mortalidade do paciente (Georghiou et al., 2017). Ressalta-se então a importância da identificação precoce destes perfis de resistência principalmente à medicamentos de segunda linha e terceira linha do tratamento, uma vez que em torno de 50-70% dos pacientes tratados para TB-MDR e TB-XDR acabam em falha do tratamento (Katale et al., 2020). Ao comparar os perfis de resistência da cepa R1667, conclui-se que ela é caracterizada como pré-TB-XDR, com base em dados genômicos, o que sugere um desfecho clínico que não foi identificado pelo teste MGIT.

As cepas R489 e R2008, identificadas como resistentes a INH, RIF e ETO, e a INH e ETO, respectivamente, apresentaram uma mutação na região promotora do gene *fabG1* (-15C>T). Juntamente ao gene *inhA*, estes são responsáveis pela codificação e biossíntese de enzimas responsáveis pela síntese do ácido micólico, e compartilham a mesma região regulatória (Khawbung; Nath; Chakraborty, 2021). Ademais, as mesmas cepas possuem também uma mutação no gene *katG*, e cumulativamente, esta redundância está relacionada com níveis altíssimos de resistência à INH (Lavender et al., 2005; Nimmo et al., 2022).

Além da predição da resistência de forma semiquantitativa, o processamento dos dados genômicos advindos do WGS é capaz de identificar as linhagens filogenéticas de cada genoma através da determinação *in silico* do perfil de *spoligotyping*, estes feitos pelos softwares SpolPred e Spotyping (Xia; Teo; Ong, 2016; Coll et al., 2012). Atualmente, existem nove linhagens de *M. tuberculosis* identificadas e distribuídas em regiões geográficas específicas (Gagneux, 2012; Ordaz-Vázquez et al., 2023).

Nas Américas, a tuberculose é causada principalmente pela linhagem 4, também conhecida como linhagem euro-americana, identificada em todas as cepas do presente estudo pela análise filogenética (Nguyen, 2016). A linhagem 4 consiste em 10 famílias diferentes, nas quais 5 famílias principais LAM, T, X, Haarlem e S que estão espalhadas por todo o mundo (Nguyen, 2016). A família LAM (Latino-americana), parece ser a linhagem de MTB mais prevalente globalmente, respondendo por ~15% da carga global de TB, sendo ela também mais presente nos países da América do Sul, Central e Caribe (Lagos et al., 2016; Costa et al., 2013).

No Brasil, Vasconcellos e colaboradores (2014) demonstraram via análise de *spoligotyping* que a família LAM da linhagem 4 representa 43,6% das cepas de MTB, seguidos pela família T (34,89%) e Harleem (18,3%). Nos nossos achados, todas as cepas foram identificadas partes da linhagem 4. Análises filogenéticas de máxima verossimilhança realizadas por Negrete-paz e colaboradores (2021) encontraram uma associação das linhagens 4.3.1 e 4.3.3 com forma pulmonar da tuberculose, já o a cepa 4.1.2.1 está associada com a forma extrapulmonar da TB, duas cepas do nosso estudo foram classificadas como sublinhagens 4.3.3 (R919 e R489).

Adicionalmente, Ajawatanawang e colaboradores (2019) constataram uma forte prevalência da sublinhagem 4.1.2.1 e a linhagem 2 (Beijing) com uma alta prevalência em todo o mundo, compreendendo mais de 50% das cepas em algumas regiões e subpopulações. Interessantemente, através de um modelo estocástico matemático, Ford e colaboradores (2013) analisaram dados de WGS e encontraram uma associação da linhagem 4 e 2 com altas taxas de mutação e a emergência mundial da TB-MDR.

De forma interessante, Chizimu e colaboradores (2023) selecionaram 50 amostras caracterizadas como resistentes no norte da Zâmbia (África), região onde predomina-se a linhagem 4, e submeteram à análise de WGS utilizando o mesmo protocolo do nosso estudo (Ford et al., 2013; Chimizu et al., 2023). Quatro das amostras apresentaram o genótipo concordante com o perfil de resistência pré-XDR, três pertencentes à sublinhagem 4.3.4.2, e uma à sublinhagem 4.1.2. Semelhantemente, as cepas R1001 (XDR) e R1667 (pré-XDR) analisadas no nosso estudo pertencem à sublinhagem 4.3.4.2, o que concorda com os resultados do autor em associar esta linhagem com altos níveis de resistência. Contudo, a análise de *clusters* revelou grande distância entre os SNPs (23 em média).

Isso reforça a hipótese apresentada pelos autores, apoiada por Meehan e colaboradores (2019), sobre a disseminação da sublinhagem ser resultante da aquisição independente de resistência, possivelmente devido à falta de adesão ou ao abandono do tratamento. Embora existam diversos perfis de resistência associados à linhagem 4 do MTB, não há evidências que indiquem que o genótipo de resistência aos antibióticos esteja verticalmente ligado a padrões específicos de linhagens. Pelo contrário, a maioria das sublinhagens apresentou uma variedade de genótipos de resistência, como demonstram nossos resultados. Esses achados são corroborados por análises de WGS de grande amostragem disponíveis na literatura, que também utilizaram o software TB-Profiler para a identificação das linhagens (Baena et al., 2023).

Contudo, um estudo recente coletou dados genômicos de 755 isolados com um espaçamento de 15 anos de uma cidade do México, analisados pela ferramenta baseada em PCR MIRU-VNTR, e, através da análise de regressão logística, associaram a linhagem 4 à presença de cavitações pulmonares. 730 dos isolados pertenciam à linhagem 4, e 531 apresentavam o sintoma clássico da infecção por TB. Estes resultados trazem uma visão clara do dinamismo presente na transmissão de cepas resistentes, reforçando a problemática do tratamento inadequado como catalizador da emergência dos piores quadros de resistência. A predição realizada pelas análises genômicas completas trazem uma solução efetiva de controle e prevenção, levando à menos tratamentos errôneos, e, conseqüentemente, menos casos de infecções resistentes (Meehan et al., 2019).

Dada suas inúmeras análises, o WGS pode ser utilizado como uma ferramenta de predição de resistência a medicamentos para os quais os testes fenotípicos de suscetibilidade não são totalmente confiáveis, especialmente nos casos em que a resistência é detectável apenas no nível genômico, como no caso da cepa R1192 e R1512, que mostrou perfil de resistência do tipo MDR através das análises de WGS. Contudo, se feito apenas o teste fenotípico e o molecular Xpert MTB/RIF, ela seria classificada como monorresistente.

Nos últimos anos, o WGS tem se consolidado como uma ferramenta crucial na previsão da resistência a fármacos anti-TB, desempenhando um papel fundamental na orientação dos testes de suscetibilidade (Meehan et al., 2019'; Cohen et al., 2019). O uso de softwares automatizados, como o TB-Profiler, aliado ao constante desenvolvimento de ferramentas ainda mais inovadoras, tem mostrado resultados promissores, especialmente na predição da resistência a múltiplas drogas (MAHÉ et al., 2019; WANG et al., 2022).

Em última análise, nossos resultados são corroborados por estudos que destacam a eficácia da análise do WGS em associação com o TB-Profiler, utilizando o sistema Illumina MiSeq, garantindo os melhores resultados de análise de sequenciamento dentro dos softwares disponíveis (van Beek et al., 2019; Ngo; Teo, 2019). Quando combinado com modelos de dados supervisionados de alta abrangência, como o catálogo da WHO, o poder de predição de resistência do WGS é significativamente ampliado (MAHÉ et al., 2019; WANG et al., 2022; HE et al., 2024).

Os achados deste estudo destacam a necessidade de aprofundar a pesquisa para desenvolver estratégias que possam aprimorar ainda mais a eficácia do WGS

como ferramenta de predição de resistência ao tratamento da TB. Uma das principais limitações do estudo é a ausência de resultados fenotípicos para as drogas de segunda linha. Além disso, é fortemente recomendada a continuidade da análise com um número maior de amostras, complementada pela inclusão de um teste de sensibilidade a drogas (TSD) fenotípico adicional, como o ensaio *in vitro* de concentração inibitória mínima (do inglês, *Minimum Inhibitory Concentration* – MIC), para proporcionar uma validação mais robusta dos achados. No entanto, a análise comparativa realizada permitiu validar o papel do WGS como uma ferramenta eficaz para predição, identificação e caracterização de mutações de resistência, além de evidenciar o impacto dessas mutações no tratamento e no desfecho da infecção por TB-DR.

A predição quantitativa de resistência a fármacos ainda representa um desafio significativo, mas a capacidade do sequenciamento genômico de reduzir o tempo de análise e fornecer informações detalhadas sobre a sensibilidade genotípica à maioria dos medicamentos necessários para o tratamento da TB-MDR é crucial. Essa capacidade não apenas contribui para evitar desfechos desfavoráveis no tratamento de pacientes acometidos, mas também justifica o contínuo investimento nessa ferramenta. Alinhando cada vez mais os métodos diagnósticos aos princípios estabelecidos pelo plano END-TB, o WGS tem o potencial de transformar a abordagem ao tratamento da TB.

A implementação planejada da medicina de precisão em países com alta carga de TB e recursos limitados, aliada ao uso de tecnologias avançadas, como a análise multiômica e o aprendizado de máquina, tem o potencial de transformar significativamente o tratamento da TB (Meehan et al., 2019). Os dados gerados pelo WGS poderão ser enriquecidos por dados experimentais, como mutagênese de nucleotídeo único, seguida de triagens fenotípicas sistemáticas, estudos multiômicos e abordagens de aprendizado de máquina para prever o fenótipo de resistência. Esses avanços permitirão a individualização do tratamento da TB para cada paciente, com base no genoma específico da cepa de MTB contraída, resultando em desfechos mais favoráveis e um controle mais eficaz da doença.

7 CONCLUSÃO

A pesquisa apresentada destaca o WGS como uma alternativa promissora para diagnosticar a resistência emergente a medicamentos no MTB. A análise comparativa e os resultados obtidos confirmam a eficácia desse método avançado de diagnóstico genômico em fornecer informações detalhadas sobre resistência a múltiplos medicamentos (TB-MDR e TB-XDR). A análise da cepa resistente, especialmente a TB-MDR, possibilita a personalização dos tratamentos, otimizando os resultados terapêuticos e enfrentando de forma mais eficaz os desafios da resistência medicamentosa.

Ainda existem inconsistências entre o fenótipo e o genótipo de resistência a medicamentos. Isso destaca a necessidade de estudos mais aprofundados e catálogos atualizados de mutações de resistência para uma análise rápida e precisa dos dados de WGS, permitindo o reconhecimento precoce da resistência medicamentosa. Para o uso do WGS como ferramenta inicial em predição e diagnóstico de resistência, são necessários fluxos de trabalho padronizados, robustos e escaláveis, especialmente em países com alta carga de TB, como o Brasil. Enquanto essa viabilidade se desenvolve, sugerimos o uso do WGS como metodologia complementar a testes rápidos como o Xpert MTB/RIF Ultra e precisos como o MGIT.

Todavia, em condições adequadas de qualidade, observamos uma concordância satisfatória nos resultados da análise do genótipo de resistência para os medicamentos determinantes de uma estirpe de MDR, INH e RIF. Especialmente nas cepas de ID R1512 e R1192, a análise do WGS foi capaz de prever a resistência genotípica que ainda não foi expressa, especialmente em mutações incomuns como a Ile491Phe no gene *rpoB*. Esses resultados abrem portas para o contínuo investimento no uso da medicina de precisão como ferramenta de diagnóstico, provendo tratamentos mais eficazes e a redução da carga da TB-MDR e TB-XDR no Brasil.

REFERÊNCIAS

- Acharya, B. et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Biology Reports*, v. 47, n. 5, p. 4065–4075, 4 abr. 2020.
- Ajawatanawong et al. A novel Ancestral Beijing sublineage of *Mycobacterium tuberculosis* suggests the transition site to Modern Beijing sublineages. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 23 set. 2019.
- Alonso, M. et al. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 7, p. 2688–2690, 1 jul. 2011.
- Andries, K. et al. Acquired Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Bedaquiline. *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, p. e102135, 10 jul. 2014.
- Ardito, F. et al. Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 12, p. 4440–4444, 1 dez. 2001.
- Bañuls, A. et al. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of Medical Microbiology*, v. 64, n. 11, nov. 2015.
- Barberis, I. et al. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch 's bacillus. *Journal of preventive medicine and hygiene*, v. 58, n. 1, p. E9–E12, 2017
- Basta, P. C. As pestes do século XX: tuberculose e AIDS no Brasil, uma história comparada. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 22, n. 2, p. 456–458, fev. 2006.
- Bolger, A. M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 abr. 2014.
- Bozzano, F.; Marras, F.; De Maria, A. IMMUNOLOGY OF TUBERCULOSIS. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, v. 6, n. 1, p. e2014027, 7 abr. 2014.
- Brandao, A. P. et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* presenting unusually high discordance between genotypic and phenotypic resistance to rifampicin in an endemic tuberculosis setting. *Tuberculosis*, v. 125, p. 102004, dez. 2020.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Tuberculose. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. [s.l.], n. especial, mar. 2024.

Brasil. Ministério da Saúde. Relatório de Recomendação: Pretomanida para o tratamento da tuberculose resistente a medicamentos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Complexo da Saúde - SECTICS, Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde - DGITS. [s.l.]. v. preliminar, ago 2023.

Brites, D. et al. A New Phylogenetic Framework for the Animal-Adapted *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 27 nov. 2018.

Brites, D.; Gagneux, S. Strain Variation in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York, p.1-26, 2017. Springer International Publishing.

Cabibbe, A. M. et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. *European Respiratory Journal*, v. 52, n. 5, p. 1801163, 12 set. 2018.

Cambau, E. et al. Revisiting susceptibility testing in TB-MDR by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study. v. 70, n. 3, p. 686–696, 1 mar. 2015.

Campbell, P. J. et al. Molecular Detection of Mutations Associated with First- and Second-Line Drug Resistance Compared with Conventional Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 5, p. 2032–2041, 7 fev. 2011.

Campos, R.; Pianta, C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil. *Bol. da Saúde*, v. 15, n. 1, p. 61, 2001.

Campos, H. et al. Diagnóstico da Tuberculose. *Pulmão RJ*, v. 15, n. 2, p. 92-99, 2006

Chakravorty, S. et al. The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Resistance to Rifampin in an Assay Suitable for Point-of-Care Testing. *mBio*, v. 8, n. 4, 6 set. 2017.

Chai, Q. et al. New insights into the evasion of host innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 17, n. 9, p. 901–913, 29 jul. 2020

Chandra, P.; Grigsby, S. J.; Philips, J. A. Immune evasion and provocation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, 25 jul. 2022.

Chisholm, R. H. et al. Controlled fire use in early humans might have triggered the evolutionary emergence of tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 113, n. 32, p. 9051–9056, 2016

Chitale, P. et al. A comprehensive update to the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv reference genome. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 7068, 18 nov. 2022.

Churchyard, G. et al. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. suppl_6, p. S629–S635, 1 out. 2017.

Cole, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, v. 393, n. 6685, p. 537–544, jun. 1998.

Coleman, M. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Transmission in High-Incidence Settings—New Paradigms and Insights. *Pathogens*, v. 11, n. 11, p. 1228, 1 nov. 2022.

Coll, F. et al. SpolPred: rapid and accurate prediction of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes from short genomic sequences. *Bioinformatics*, v. 28, n. 22, p. 2991–2993, 26 set. 2012.

Coll et al. PolyTB: A genomic variation map for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, v. 94, n. 3, p. 346–354, 1 maio 2014.

Coll, F. et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Medicine*, v. 7, n. 1, 27 maio 2015.

Comas, I. et al. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nature genetics*, v. 44, n. 1, p. 106–110, 2011.

Comín, J. et al. The MtZ Strain: Molecular Characteristics and Outbreak Investigation of the Most Successful *Mycobacterium tuberculosis* Strain in Aragon Using Whole-Genome Sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, 24 maio 2022.

Conkle-Gutierrez, D. et al. Novel and reported compensatory mutations in *rpoABC* genes found in drug resistant tuberculosis outbreaks. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 8 jan. 2024.

Cook, G. M. et al. Physiology of *Mycobacteria*. *Advances in Microbial Physiology*, v. 55, p. 81–319, 2009.

Coscolla, M.; Gagneux, S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Seminars in Immunology*, v. 26, n. 6, p. 431–444, dez. 2014.

Coscolla, M. Biological and Epidemiological Consequences of MTBC Diversity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1019, p. 95–116, 2017.

Costa, E. R. et al. Mycobacterium tuberculosis of the RD Rio Genotype Is the Predominant Cause of Tuberculosis and Associated with Multidrug Resistance in Porto Alegre City, South Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 1071–1077, abr. 2013.

Cox, H. et al. Whole-Genome Sequencing Has the Potential To Improve Treatment for Rifampicin-Resistant Tuberculosis in High-Burden Settings: a Retrospective Cohort Study. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 60, n. 3, 16 mar. 2022.

Cruz-Knight, W.; Blake-Gumbs, L. Tuberculosis: an overview. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, v. 40, n. 3, p. 743-756, 2013.

Daniel, T. M. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, v. 4, n. 5, p. 395–400, 2000.

Daniel, T. M. *Pioneers in Medicine and their Impact on Tuberculosis*. Rochester, NY: University of Rochester Press, 2000b. v. 29

Dantas, João Carlos Pinheiro; FROTA, Cristiane Cunha. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre a cepa padrão H37Rv. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Patologia Tropical, Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

Dartois, V. A.; Rubin, E. J. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: Challenges and priorities. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, p. 685–701, 27 abr. 2022.

De Jong, B. C.; Antonio, M.; Gagneux, S. Mycobacterium africanum—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 9, p. e744, 28 set. 2010.

Donoghue, H. D. et al. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *The Lancet infectious diseases*, v. 4, n. 9, p. 584–592, 2004.

Dookie, N. et al. Application of Next Generation Sequencing for Diagnosis and Clinical Management of Drug-Resistant Tuberculosis: Updates on Recent Developments in the Field. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 24 mar. 2022.

Dorman, S. E. et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *The Lancet. Infectious Diseases*, v. 18, n. 1, p. 76–84, 1 jan. 2018.

Ernst, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 8, p. 581–591, 13 jul. 2012.

Ferraz-Carvalho, Rafaela S. et al. Effects of the encapsulation of usnic acid into liposomes and interactions with antituberculous agents against multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 5, p. 330–334, 2016

Frascella, B. et al. Subclinical tuberculosis disease - a review and analysis of prevalence surveys to inform definitions, burden, associations and screening methodology. *Clinical Infectious Diseases*, 16 set. 2020.

Frith, J. History of tuberculosis Part 1 - Phthisis, consumption and the White Plague. *Journal of Military and Veterans' Health*, v. 22, n. 2, 2014.

Forbes, B. A. et al. Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 31, n. 2, 31 Jan. 2018.

Ford, C. B. et al. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug resistant tuberculosis. *Nature genetics*, v. 45, n. 7, p. 784–790, 1 jul. 2013.

Gagneux, S. Host–pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 367, n. 1590, p. 850–859, 19 mar. 2012.

Genestet, C. et al. Whole-genome sequencing in drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in routine practice in Lyon, France. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 55, n. 4, p. 105912, abr. 2020.

Georghiou, S. B. et al. Increased Tuberculosis Patient Mortality Associated with *Mycobacterium tuberculosis* Mutations Conferring Resistance to Second-Line Antituberculous Drugs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 55, n. 6, p. 1928–1937, 1 jun. 2017.

Gill, C. M. et al. New developments in tuberculosis diagnosis and treatment. *Breathe*, v. 18, n. 1, p. 210149, mar. 2022.

Gröschel, M. I. et al. GenTB: A user-friendly genome-based predictor for tuberculosis resistance powered by machine learning. *Genome Medicine*, v. 13, n. 1, 30 ago. 2021.

Goodwin, S.; Mcpherson, J. D.; Mccombie, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews. Genetics*, v. 17, n. 6, p. 333–51, 2016.

Gordon, S. V.; Parish, T. Microbe Profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiology*, v. 164, n. 4, p. 437–439, 1 abr. 2018.

Guo, Q. et al. Whole Genome Sequencing Identifies Novel Mutations Associated With Bedaquiline Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, 27 maio 2022.

Gupta, M.; ISH, P.; Malhotra, N. Recent updates in diagnosis and management of drug-resistant tuberculosis in India: A paradigm shift and the way ahead during the COVID-19 crisis. *Indian Journal of Tuberculosis*, ago. 2021.

Gutierrez, M. C. et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, v. 1, n. 1, p. e5, 2005.

Hazbón, M. H. et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 8, p. 2640–2649, 1 ago. 2006.

Hazra, D. et al. Impact of Whole-Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* on Treatment Outcomes for TB-MDR/XDR-TB: A Systematic Review. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 12, p. 2782, 2023.

He, G. et al. Prediction of treatment outcomes for multidrug-resistant tuberculosis by whole-genome sequencing. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 96, p. 68–72, jul. 2020.

He, G. et al. Evaluation of WHO catalog of mutations and five WGS analysis tools for drug resistance prediction of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Microbiology Spectrum*, 21 jun. 2024.

Hu, T. et al. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, v. 82, n. 11, 19 mar. 2021.

Huf, Gisele et al. Avaliação da utilidade clínica de novos testes diagnósticos em tuberculose: o papel dos ensaios clínicos pragmáticos. *J Bras Pneumol*, v. 38, n. 2, p. 237-245, 2012.

Hett, E. C.; Rubin, E. J. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 72, n. 1, p. 126–156, 1 mar. 2008.

Heemskerk, D., Caws, M., Marais, B., et al. *Tuberculosis in Adults and Children*. London: Springer, 2015. Capítulo 2, Patogênese.

Heyckendorf, J. et al. What Is Resistance? Impact of Phenotypic versus Molecular Drug Resistance Testing on Therapy for Multi- and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 2, fev. 2018.

Hoagland, D. T. et al. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 102, p. 55–72, jul. 2016.

Huang, H. et al. Analyzing the M. tuberculosis immune response by T cell receptor clustering with GLIPH2 and genome-wide antigen screening. *Nature biotechnology*, v. 38, n. 10, p. 1194, 1 out. 2020.

Huang, Y. et al. Review and Updates on the Diagnosis of Tuberculosis. *Journal of Clinical Medicine*, v. 11, n. 19, p. 5826, 1 jan. 2022.

Huang, W. et al. Evaluation of Xpert MTB/RIF Ultra assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance. *Pathology*, v. 55, n. 5, p. 688–697, 1 ago. 2023.

Iketleng, T. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Next-Generation Whole Genome Sequencing: Opportunities and Challenges. *Tuberculosis Research and Treatment*, v. 2018, p. 1–8, 9 dez. 2018.

Jajou, R. et al. WGS more accurately predicts susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs than phenotypic testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 74, n. 9, p. 2605–2616, 22 maio 2019.

Jang, J. et al. Horizontally acquired genomic islands in the tubercle bacilli. *Trends in microbiology*, v. 16, n. 7, p. 303–308, 2008.

Jang, J. G.; CHUNG, J. H. Diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Yeungnam University Journal of Medicine*, v. 37, n. 4, p. 277–285, 4 set. 2020.

Kalscheuer, R. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochemical Journal*, v. 476, n. 14, p. 1995–2016, 18 jul. 2019.

Kanabalan, R. D. et al. Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. *Microbiological Research*, v. 246, p. 126674, 4 mai. 2021.

Katale, B. Z. et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates and clinical outcomes of patients treated for multidrug-resistant tuberculosis in Tanzania. *BMC Genomics*, v. 21, n. 1, 21 fev. 2020.

Kathryn, R. C. et al. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*, v. 14, n. 1, 23 nov. 2022.

Khawbung, J. L.; Nath, D.; Chakraborty, S. Drug resistant Tuberculosis: A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 74, p. 101574, fev. 2021.

Knechel, N. A. Tuberculosis: Pathophysiology, Clinical Features, and Diagnosis. *Critical Care Nurse*, v. 29, n. 2, p. 34–43, 1 abr. 2009.

Koh, W.-J. et al. Rapid Diagnosis of Tuberculosis and Multidrug Resistance Using a MGIT 960 System. *Annals of Laboratory Medicine*, v. 32, n. 4, p. 264, 2012.

Koleske, B. N.; Jacobs Jr, W. R.; Bishai, W. R. The *Mycobacterium tuberculosis* genome at 25 years: lessons and lingering questions. *J Clin Invest*, v. 133, n. 19, e173156, 2 out. 2023.

Kohl, T. et al. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. PeerJ, v. 6, p. e5895–e5895, 13 nov. 2018.

Köser, C. U. et al. Importance of the Genetic Diversity within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex for the Development of Novel Antibiotics and Diagnostic Tests of Drug Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, n. 12, p. 6080–6087, 24 set. 2012.

Lagos, J. et al. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Genotypic Lineage Distribution in Chile and Neighboring Countries. PLoS ONE, v. 11, n. 8, p. e0160434–e0160434, 12 ago. 2016.

Lam, C. et al. Value of routine whole genome sequencing for *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance detection. International Journal of Infectious Diseases, v. 113, p. S48–S54, dez. 2021.

Lavender, C. et al. Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Collected in Australia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, n. 10, p. 4068–4074, 27 set. 2005.

Lee, R. S. et al. Previously undetected super-spreading of *Mycobacterium tuberculosis* revealed by deep sequencing. eLife, v. 9, 4 fev. 2020.

Li, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 8 jun. 2009.

Liang, D. et al. Whole Genomic Analysis Revealed High Genetic Diversity and Drug-Resistant Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* in Guangxi, China. Infection and Drug Resistance, v. Volume 16, p. 5021–5031, 1 ago. 2023.

Machado, D.; Couto, I.; Viveiros, M. Advances in the molecular diagnosis of tuberculosis: From probes to genomes. Infection, Genetics and Evolution, v. 72, p. 93–112, 1 ago. 2019.

Mahé, P. et al. A large scale evaluation of TBProfiler and Mykrobe for antibiotic resistance prediction in *Mycobacterium tuberculosis*. PeerJ, v. 7, p. e6857, 1 maio 2019.

Maison, D. P. Tuberculosis pathophysiology and anti-VEGF intervention. Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases, v. 27, p. 100300, maio 2022.

Marakalala, M. J. et al. Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized. Nature Medicine, v. 22, n. 5, p. 531–538, 1 maio 2016.

Massabni, A. C.; Bonini, E. H. Tuberculose: história e evolução dos tratamentos da doença. Revista Brasileira Multidisciplinar, v. 22, n. 2, p. 6–34, 1 maio 2019.

Mathema, B. et al. Drivers of Tuberculosis Transmission. The Journal of Infectious Diseases, v. 216, n. suppl_6, p. S644–S653, 1 out. 2017.

Maciel, M. S. et al. A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. *Revista da Sociedade Brasileira de Tuberculose*, v. 10, n. 3, p. 226-30, 2012

Maison, D. P. Tuberculosis pathophysiology and anti-VEGF intervention. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, v. 27, p. 100300, maio 2022.

Makhado, N. A. et al. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis in South Africa undetected by WHO-endorsed commercial tests: an observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 12, p. 1350–1359, 1 dez. 2018.

Mcevoy, Christopher RE et al. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, v. 87, n. 5, p. 393-404, 2007.

Mcgrath, M. et al. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 2, p. 292–302, 1 fev. 2014

MacLean, E. et al. Advances in Molecular Diagnosis of Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 58, n. 10, 22 set. 2020.

Meehan, C. J. et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 9, p. 533–545, 17 jun. 2019.

Miggiano, R.; Rizzi, M.; Ferraris, D. M. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis, Infection Prevention and Treatment. *Pathogens*, v. 9, n. 5, p. 385, 2020.

Miller, S. A.; Dykes, D. D.; Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, v. 16, n. 3, p. 1215–1215, 1988.

Miotto, P. et al. A standardized method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *European Respiratory Journal*, v. 50, n. 6, p. 1701354, dez. 2017.

Morales-Arce, A. Y. et al. The population genomics of within-host *Mycobacterium tuberculosis*. *Heredity*, v. 126, n. 1, p. 1–9, 15 out. 2020.

Negrete-Paz, A. M.; Vázquez-Marrufo, G.; Vázquez-Garcidueñas, M. S. Whole-genome comparative analysis at the lineage/sublineage level discloses relationships between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and clinical phenotype. *PeerJ*, v. 9, p. e12128, 8 set. 2021.

Natarajan, A. et al. A systemic review on tuberculosis. *The Indian Journal of Tuberculosis*, v. 67, n. 3, p. 295–311, 1 jul. 2020.

Ngo, T.-M.; Teo, Y.-Y. Genomic prediction of tuberculosis drug-resistance: benchmarking existing databases and prediction algorithms. *BMC Bioinformatics*, v. 20, n. 1, 8 fev. 2019.

Nguyen, Quang Huy. Genetic determinants and evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Vietnam: toward new diagnostic tools. 2016. Tese (Doutorado) Curso de doutorado em Saúde Humana e Patologia - Université Montpellier. Montpellier, 2016. Disponível em: <https://theses.hal.science/tel-01560449/file/2016_NGUYEN_archivage.pdf>. Acesso em 26 mar. 2024.

Nguyen, T. N. A. et al. Molecular Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis; A Literature Review. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. 794, 16 abr. 2019.

Niemann, S. et al. Impact of Genetic Diversity on the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *Microbiology Spectrum*, v. 4, n. 6, 1 dez. 2016.

Nikolayevskyy, V. et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of recent transmission and tracing outbreaks: A systematic review. *Tuberculosis*, v. 98, p. 77–85, maio 2016.

Noorizhab, M. N. F. et al. Exploration of the diversity of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex in Lagos, Nigeria using WGS: Distribution of lineages, drug resistance patterns and genetic mutations. *Tuberculosis*, v. 140, p. 102343, 1 maio 2023.

Octora, M.; Kawilarang, A. P.; Endraswari, P. D. Challenge of Ziehl-Neelsen stain for Basidiobolomycosis diagnosis in Indonesia: A unique case report. *Annals of Medicine and Surgery*, v. 74, p. 103278, fev. 2022.

Ordaz-Vázquez, A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 associated with cavitations and treatment failure. *BMC infectious diseases*, v. 23, n. 1, p. 154, 14 mar. 2023.

Pan American Health Organization. Tuberculosis in the Americas, 2021. Washington, D.C.: PAHO, 2021.

Peloquin, C. A.; Davies, G. R. The Treatment of Tuberculosis. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 110, n. 6, p. 1455–1466, 5 jun. 2021.

Pereira, R.; Oliveira, J.; Sousa, M. Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 1, p. 132, 3 jan. 2020.

Pi, R. et al. Characterization of linezolid-resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* through WGS. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 74, n. 7, p. 1795–1798, 1 jul. 2019.

Pisu, D. et al. Single cell analysis of *M. tuberculosis* phenotype and macrophage lineages in the infected lung. *Journal of Experimental Medicine*, v. 218, n. 9, 22 jul. 2021.

Qin, D. Next-generation Sequencing and Its Clinical Application. *Cancer Biology & Medicine*, v. 16, n. 1, p. 4–10, fev. 2019.

Rabahi, M. F. et al. Tuberculosis treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 43, n. 6, p. 472–486, dez. 2017.

Ramakrishnan, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 5, p. 352–366, 20 abr. 2012.

Ramaswamy, S.; MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung Disease*, v. 79, n. 1, p. 3–29, 1998.

Rigouts et al. GeneXpert MTB/RIF Ultra performance to detect uncommon rpoB mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Research Notes*, v. 16, n. 1, 14 jul. 2023.

Rocha et al. Complete genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* in the identification of gene mutations associated with antimicrobial resistance. *International Seven Journal of Health Research*, v. 2, n. 2, 28 abr. 2023.

Rosemberg, J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, v. 7, n. 2, dez. 1999.

RUFFINO-NETTO, A.; PEREIRA, J. C. Mortalidade por tuberculose e condições de vida: o caso Rio de Janeiro. *Rev Saúde Debate*, v. 12, n. 1, p. 27–34, 1981

Ryndak, M. B.; Laal, S. *Mycobacterium tuberculosis* Primary Infection and Dissemination: A Critical Role for Alveolar Epithelial Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, 21 ago. 2019.

Sá, L. C. B. DE et al. Tuberculose faringolaríngea. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 73, p. 862–866, 1 dez. 2007.

Sanoussi, C. N. et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex lineage 5 exhibits high levels of within-lineage genomic diversity and differing gene content compared to the type strain H37Rv. *Microbial Genomics*, v. 7, n. 7, 9 jul. 2021.

Schatz, Albert; Bugle, Elizabeth; Waksman, Selman A. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 55, n. 1, p. 66–69, 1944.

Schleusener, V. et al. *Mycobacterium tuberculosis* resistance prediction and lineage classification from genome sequencing: comparison of automated analysis tools. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 20 abr. 2017.

Sheppard, D. DE S. A literatura médica brasileira sobre a peste branca: 1870-1940. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 8, n. 1, p. 173–192, jun. 2001.

Shiloh, M. U. Mechanisms of mycobacterial transmission: how does *Mycobacterium tuberculosis* enter and escape from the human host. *Future Microbiology*, v. 11, n. 12, p. 1503–1506, 1 dez. 2016.

Shivakumar, P.; Sunil Shettigar, K. Tuberculosis Diagnosis: Updates and Challenges. IntechOpen, 2023.

SLATKO, B. E.; GARDNER, A. F.; AUSUBEL, F. M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, v. 122, n. 1, p. e59, abr. 2018.

Springer, B. et al. Quantitative Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by Use of MGIT 960 and EpiCenter Instrumentation. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 6, p. 1773–1780, 1 jun. 2009.

Suárez, I. et al. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Deutsches Arzteblatt International*, v. 116, n. 43, p. 729–735, 25 out. 2019

Sieiro, T. L. A. et al. The role of the Xpert MTB/RIF assay among adolescents suspected of pulmonary tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, v. 51, n. 2, p. 234–236, 1 mar. 2018.

Silva, D. R. et al. Consenso sobre o diagnóstico da tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 47, p. e20210054, 17 maio 2021.

Sims, D. et al. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, v. 15, n. 2, p. 121–132, 17 jan. 2014.

Singh, A.; Gupta, A. K.; Singh, S. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Role of Nanoparticles Against Multi-drug-Resistant Tuberculosis (TB-MDR). *NanoBioMedicine*, p. 285–314, 2020.

Sirgel, F. A. et al. Mutations in the *rrsA1401G* Gene and Phenotypic Resistance to Amikacin and Capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbial Drug Resistance*, v. 18, n. 2, p. 193–197, 1 abr. 2012.

Smith, N. H. et al. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 7, p. 537–544, 1 jun. 2009.

Sotgiu, G. et al. The ERS-endorsed official ATS/CDC/IDSA clinical practice guidelines on treatment of drug-susceptible tuberculosis. *European Respiratory Journal*, v. 48, n. 4, p. 963–971, 1 set. 2016.

Starks, A. M. et al. Collaborative Effort for a Centralized Worldwide Tuberculosis Relational Sequencing Data Platform. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 61Suppl 3, n. Suppl 3, p. S141-146, 15 out. 2015.

Stephanie, F.; Saragih, M.; Tambunan, U. S. F. Recent Progress and Challenges for Drug-Resistant Tuberculosis Treatment. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 5, p. 592, 21 abr. 2021.

Stucki, D. et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nature Genetics*, v. 48, n. 12, p. 1535–1543, 31 out. 2016.

Sun, Q. et al. The molecular basis of pyrazinamide activity on *Mycobacterium tuberculosis* PanD. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, 17 jan. 2020.

Sun, W. et al. Prediction of drug resistance profile of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-MTB) isolates from newly diagnosed case by whole genome sequencing (WGS): a study from a high tuberculosis burden country. *BMC Infectious Diseases*, v. 22, n. 1, 27 maio 2022.

The CRyPTIC Consortium (CRyPTIC); THE 100.000 GENOMES PROJECT (CRYPTIC) et al. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing. *The New England Journal of Medicine*, v. 379, n. 15, p. 1403–1415, 2018.

The CRyPTIC Consortium (CRyPTIC). A data compendium associating the genomes of 12,289 *Mycobacterium tuberculosis* isolates with quantitative resistance phenotypes to 13 antibiotics. *PLOS Biology*, v. 20, n. 8, p. e3001721, 9 ago. 2022.

Theron, G. et al. Bacterial and host determinants of cough aerosol culture positivity in patients with drug-resistant versus drug-susceptible tuberculosis. *Nature Medicine*, v. 26, n. 9, p. 1435–1443, 29 jun. 2020.

Tiemersma, E. W. et al. Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review. *PLoS ONE*, v. 6, n. 4, p. e17601, 4 abr. 2011.

Tortoli, E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 48, n. 2, p. 159–178, nov. 2006.

Tortora, Gerard J.; FUNKE, Berdell R; CASE, Christine L. *Microbiologia*. 12 Porto Alegre: Artmed, 2017, 935 p.

Trias, J.; Benz, R. Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology*, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 283–290, 1994. ISSN: 13652958. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01289.x.

Turner, R. D.; Bothamley, G. H. Cough and the Transmission of Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 211, n. 9, p. 1367–1372, 11 nov. 2014.

Van Beek, J. et al. Evaluation of whole genome sequencing and software tools for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 1, p. 82–86, jan. 2019.

Vandervan, B. C. et al. The Minimal Unit of Infection: *Mycobacterium tuberculosis* in the Macrophage. *Microbiology spectrum*, v. 4, n. 6, 2016.

Vargas, R. et al. In-host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* complex during active disease. *eLife*, v. 10, p. e61805, 1 fev. 2021.

Vasconcellos, G. et al. Strain Classification of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Brazil Based on Genotypes Obtained by Spoligotyping, Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing and the Presence of Large Sequence and Single Nucleotide Polymorphism. PLOS ONE, v. 9, n. 10, p. e107747–e107747, 14 out. 2014.

Vázquez-Chacón, C. A. et al. Intra-host genetic population diversity: Role in emergence and persistence of drug resistance among *Mycobacterium tuberculosis* complex minor variants. Infection, Genetics and Evolution, v. 101, p. 105288, jul. 2022.

Votintseva, A. A. et al. Mycobacterial DNA Extraction for Whole-Genome Sequencing from Early Positive Liquid (MGIT) Cultures. Journal of Clinical Microbiology, v. 53, n. 4, p. 1137–1143, abr. 2015.

Walker, T. M. et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. The Lancet Infectious Diseases, v. 13, n. 2, p. 137–146, fev. 2013.

Walker, T. M. et al. A cluster of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among patients arriving in Europe from the Horn of Africa: a molecular epidemiological study. The Lancet. Infectious Diseases, v. 18, n. 4, p. 431–440, 1 abr. 2018.

Wassersug, J. D. Pulmonary tuberculosis. New England Journal of Medicine, v. 235, n. 7, p. 220–229, 1946

Williamson, D. L. et al. Clinical failures associated with *rpoB* mutations in phenotypically occult multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, v. 16, n. 2, p. 216–220, 1 fev. 2012.

World Health Organization (WHO). WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection, third edition : 2021 update. Genebra: WHO. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240089488>. Acesso em: 2 abr. 2024.

World Health Organization (WHO). Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2021b.

World Health Organization (WHO). WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection, third edition: 2022 update. Genebra: WHO. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/365308> Acesso em: 15 mai. 2024.

World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report. Geneva: World Health Organization, 2023.

World Health Organization. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. [s.l.] World Health Organization, 2023b.

Xia, E.; Teo, Y.-Y.; Ong, R. T.-H. Spolyping: fast and accurate in silico *Mycobacterium* spoligotyping from sequence reads. *Genome Medicine*, v. 8, n. 1, 17 fev. 2016.

Xie, Y. L. et al. Xpert MTB/RIF Ultra versus mycobacterial growth indicator tube liquid culture for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in symptomatic adults: a diagnostic accuracy study. *The Lancet. Microbe*, v. 5, n. 6, p. e520–e528, 1 jun. 2024.

Ye, M. et al. Antibiotic heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 20, n. 1, 13 out. 2021.