



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

**CAROLINA PESSOA DE MATOS CABO**

***O PANORAMA ACTUAL DA TUBERCULOSE  
MULTIRRESISTENTE***

**ARTIGO DE REVISÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE PNEUMOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROFESSOR DOUTOR CARLOS ROBALO CORDEIRO**

**DR<sup>a</sup>. SARA FREITAS**

**MARÇO/2013**

## ***O PANORAMA ACTUAL DA TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE***

Carolina Pessoa de Matos Cabo<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

### **Correspondência:**

Carolina Pessoa de Matos Cabo

Mestrado Integrado em Medicina- 6º ano

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Morada: Rua Brigadeiro Correia Cardoso, 98, 1º DTO, 3000-083 Coimbra

Email: [carolinapmatoscabo@gmail.com](mailto:carolinapmatoscabo@gmail.com)

## Resumo

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar do declínio na incidência e mortalidade desta doença, principalmente nos países industrializados, o surgimento de novas formas de tuberculose, resistentes aos fármacos tuberculostáticos existentes, constitui actualmente um dos maiores problemas de saúde pública. Vários factores estão relacionados com o aparecimento de resistência, através de alterações genéticas. A infecção por HIV parece ser um factor de risco importante, apesar da sua relação com a resistência a tuberculostáticos não estar ainda bem esclarecida.

A tuberculose multirresistente (MDR-TB) define-se pela resistência a pelo menos isoniazida e rifampicina. O desenvolvimento posterior de tuberculose extensamente resistente (XDR-TB), caracterizada por resistência a isoniazida e rifampicina associada a resistência a fluoroquinolonas e a pelo menos um injectável (capreomicina, kanamicina ou ampicacina), veio agravar ainda mais o panorama da TB a nível mundial.

O diagnóstico e tratamento destes doentes é um desafio para os actuais programas de controlo de tuberculose, devido não só à falta de capacidade laboratorial principalmente em países com menos recursos, mas também às opções terapêuticas disponíveis, mais onerosas, menos seguras e eficazes do que os fármacos usados na TB susceptível a fármacos. Actualmente, surgem novas opções diagnósticas baseadas essencialmente em técnicas moleculares. Está em curso, igualmente, o desenvolvimento de outras estratégias terapêuticas, não só com o aparecimento de novas moléculas, mas também com novas formas e vias de administração ou abordagens não farmacológicas, em casos particulares.

Assim, pretendeu-se com este trabalho obter uma perspectiva global deste tema vasto e complexo, sintetizar os principais mecanismos de resistência e factores de risco associados à

MDR-TB, sistematizar princípios diagnósticos e regimes terapêuticos recomendados a nível internacional, e englobar as novas abordagens diagnósticas e terapêuticas propostas por estudos recentes, à luz do contexto epidemiológico actual. É, ainda, apresentado um caso clínico representativo.

**Palavras-chave**

Tuberculose multirresistente; tuberculose extensamente resistente; tuberculose; isoniazida; rifampicina; resistência

## Abstract

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Despite the declining prevalence and mortality of the disease, especially in developed countries, the emergence of new forms of TB, resistant to anti-tuberculosis drugs, presents one of the current major public health problems in the world. Several factors are related with the emergence of resistance through genetic mutation. HIV infection may be an important risk factor, although its role in the development of resistance to anti-tuberculosis drugs remains unclear.

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is defined as disease with bacillary resistance to at least isoniazid and rifampicin. Further development of extensively drug-resistant tuberculosis, defined as disease with bacillary resistance to isoniazid and rifampicin with additional resistance to fluoroquinolones and at least one of the second-line injectables (capreomycin, kanamycin or amikacin), has worsened the global TB epidemic situation.

Diagnosing and treating these patients is a challenge to national TB programmes, due not only to the lack of laboratorial capacity especially in developing countries, but also to the available anti-tuberculosis drugs, more expensive, but less safe and potent than those used to treat TB caused by drug-susceptible strains. Currently, new diagnostic strategies based on molecular tools are emerging. The development of new treatment strategies is also in progress with new compounds, formulations and administration routes and, in specific cases, non-pharmacological approaches.

To give a general insight of this broad and complicated issue, to sum up the main resistance mechanisms and risk factors associated with MDR-TB, to organize the internationally recommended diagnosis strategies and treatment regimens and to comprehend new diagnosis

and treatment approaches based on recent evidence were this review's proposals. A clinical case from a MDR-TB patient is also reported.

**Key words:**

Multidrug-resistant tuberculosis; extensively drug-resistant tuberculosis; tuberculosis; isoniazid; rifampicin; resistance

## Índice

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>7</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>8</b>
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>9</b>
<b>Desenvolvimento</b> .....	<b>10-40</b>
Dados epidemiológicos da Tuberculose .....	10-11
Patogenia da Tuberculose .....	11-14
Regimes de tratamento da Tuberculose.....	14-17
Mecanismos de resistência .....	17-20
MDR-TB e XDR-TB - definição.....	21
Dados epidemiológicos da MDR-TB e XDR-TB.....	21-22
Factores de risco e associação ao HIV .....	23-25
Manifestações clínicas .....	25-26
Métodos de Diagnóstico .....	26-31
Tratamento e Prognóstico.....	31-38
Caso clínico .....	38-40
<b>Conclusão</b> .....	<b>41</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>42-46</b>

**Lista de Abreviaturas:**

BK – Bacilo de Koch

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ETB – Etambutol

IMC – Índice de massa corporal

INH – Isoniazida

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

LEDs – Díodos emissores de luz

MDR-TB – Tuberculose Multirresistente

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAS – Ácido Paraminossalicílico

PCR – *Polymerase chain reaction*

PZN – Pirazinamida

RIF – Rifampicina

S – Estreptomicina

TB – Tuberculose

TOD – Toma sob observação directa

TSA – Teste de susceptibilidade a antibacilares

XDR-TB – Tuberculose Extensamente Resistente



## Introdução

A tuberculose, doença infecciosa causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, tem vindo, nos últimos anos, a apresentar um declínio significativo na sua prevalência e mortalidade. Apesar disso, a TB continua a ser um dos maiores problemas de saúde pública e uma das doenças infecciosas que mais mata a nível mundial, nomeadamente em países em vias de desenvolvimento. Para isso contribui a associação ao HIV e o desenvolvimento de estirpes de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos anti-bacilares. A TB multirresistente (MDR-TB) e extensamente resistente (XDR-TB) são actualmente dois dos maiores obstáculos ao controlo da epidemia de TB.

A MDR-TB, definida como TB resistente a pelo menos isoniazida e rifampicina, os dois fármacos mais eficazes para tratamento desta patologia, apresenta-se como um tipo de TB particularmente importante motivando, desde a sua definição, diversos estudos a nível mundial. Com o surgimento em 2006 da XDR-TB, MDR-TB com resistência adicional a fluoroquinolonas e a pelo menos um injectável (capreomicina, kanamicina ou amicacina), novos estudos foram conduzidos. Sendo este tema recente e com significativas actualizações nos últimos anos, este artigo pretende fazer um ponto da situação da MDR-TB a nível mundial, com os mais recentes dados epidemiológicos, particularizando o panorama português, em que a TB infelizmente é ainda uma realidade. Os principais factores de risco e manifestações clínicas são aqui sintetizados, assim como a relação com a infecção por HIV, ainda pouco clara. O diagnóstico e tratamento da MDR-TB, pontos de grande importância, estão sistematizados de acordo com as recomendações actuais, sendo complementados com novas técnicas diagnósticas e fármacos em investigação, novas abordagens e estratégias de actuação. Finalmente, é descrito um caso clínico representativo, a sua evolução, abordagem diagnóstica e terapêutica.

## Material e métodos

A pesquisa bibliográfica foi realizada utilizando a base de dados *PubMed* e recorrendo aos termos seguintes: *multidrug-resistant tuberculosis*, *extensively drug-resistant tuberculosis*, *drug-resistant tuberculosis*. Limite temporal: de 2003 a 2012. Foram incluídos alguns artigos anteriores a 2003, cujos trabalhos foram essenciais para a compreensão de outros artigos referidos. Apenas foram considerados artigos publicados em inglês, castelhano ou português. Além disto, foi feita uma pesquisa no website da Organização Mundial de Saúde e no website do *US Centers for Disease Control and Prevention* para relatórios sobre a MDR-TB e XDR-TB. O caso clínico foi obtido através da base de dados do Centro de Diagnóstico Pneumológico de Coimbra, mediante autorização prévia.

## **Desenvolvimento**

### **Dados epidemiológicos da Tuberculose**

A prevalência estimada de tuberculose (TB) a nível mundial em 2011 foi de 12 milhões de casos (170 casos por 100 000 habitantes) [1]. A maior parte dos casos em 2011 ocorreram na Ásia (59%) e em África (26%), enquanto na Região Leste do Mediterrâneo, Europa e América se registaram menos casos (7.7%, 4,3% e 3%, respectivamente) [1]. Os 5 países com maior incidência de tuberculose em 2011 foram a Índia (2-2,5 milhões), a China (0.9-1.1 milhões), a África do Sul (0,4-0,6 milhões), a Indonésia (0,4-0,5 milhões) e o Paquistão (0,3-0,5 milhões). A Índia e a China registaram, respectivamente, 26% e 12% de toda a incidência mundial desta patologia [1].

Dos 8,7 milhões de casos em 2011, cerca de 1,1 milhões (13%) foram em doentes infectados pelo HIV, registando-se a maior parte destes casos em África (79% dos casos de tuberculose em indivíduos com HIV, a nível mundial) [1]. Estima-se que 0,5 milhões de casos se registaram em crianças e 2,9 milhões em mulheres [1].

Em Portugal, a incidência de TB em 2011 foi de 2388 casos (21 casos por cada 100 000 habitantes), sendo o número de casos previamente sujeitos a tratamento de 157 [2]. A prevalência de TB associada ao HIV foi de 11% (256 casos diagnosticados) [2]. Portugal tem a 2<sup>a</sup> maior percentagem de seropositividade para o HIV entre casos de TB dos países da União Europeia e Área Económica Europeia [3]. Apesar disso, entre 2008 e 2010 houve em Portugal uma diminuição clara do número de casos de TB com seropositividade para HIV associada [3]. Em 2011, 372 casos (16,6%) de TB ocorridos em Portugal ocorreram em estrangeiros [2]. Entre 2002 e 2011, a taxa de notificação de casos de TB diminuiu em média anualmente 6,4%, aproximando-se da média europeia [2].

As taxas de incidência de TB a nível mundial foram relativamente estáveis de 1990 a 2001, tendo começado depois a diminuir [1]. Entre 2010 e 2011 registou-se um decréscimo de 2,2% [1]. A taxa de prevalência diminuiu 36% a nível mundial desde 1990, tendo atingido na América em 2005 metade do nível de 1990 [1].

O número de mortes por tuberculose em 2011 foi de aproximadamente 1,4 milhões, ou seja, 20 por 100 000 habitantes, das quais 0,43 milhões foram mortes associadas à infecção pelo HIV e 0,5 milhões foram mulheres [1]. As taxas de mortalidade diminuíram globalmente 41% desde 1990 [1]. Em Portugal, excluindo os pacientes infectados pelo HIV, o número de mortos em 2011 foi de 130 [4].

### **Patogenia da Tuberculose**

A TB é uma doença causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* e *M. mungi*) [5]. A TB em seres humanos é causada maioritariamente por *M. tuberculosis*, mas o *M. bovis* e o *M. africanum* continuam a ter um papel importante enquanto agentes de TB em humanos nalgumas regiões do globo [6].

O *M. tuberculosis* é transmitido através de gotas aerossolizadas pela tosse, espirro ou fala [5]. As partículas podem permanecer no ar durante várias horas, ocorrendo transmissão quando uma partícula contendo *M. tuberculosis* é inalada, atravessa as vias respiratórias e chega aos alvéolos pulmonares [5]. A transmissão é influenciada fundamentalmente pela susceptibilidade do indivíduo, pelo número de bactérias expelido para o ar, por factores ambientais (concentração de bactérias no ar, ventilação, circulação e pressão do ar, espaço e manuseamento de amostras contaminadas) e pela duração, frequência e intimidade do contacto [5].

Ao chegarem aos alvéolos, as bactérias são fagocitadas pelos macrófagos alveolares e pelas células dendríticas, sendo que estas últimas migram depois para os gânglios linfáticos [7]. O macrófago representa um papel importante na resposta ao *M. tuberculosis*, uma vez que é a primeira célula efectora na defesa do organismo e por outro lado constitui o *habitat* para a bactéria [7]. A fagocitose da bactéria inicia-se após o seu contacto com a manose do macrófago e/ou receptores do complemento [8]. Outros receptores como o receptor para a proteína surfactante A, receptores *scavenger* A e B e receptores lecitina tipo C estão também associados à entrada da micobactéria na célula macrofágica [7].

Sabe-se que o macrófago alveolar infectado liberta várias citocinas para recrutar diferentes populações celulares, entre elas macrófagos, monócitos, linfócitos e neutrófilos, para o local da infecção [8]. Estudos revelam que os receptores *Toll-like* (TLRs) nos macrófagos são responsáveis pelo reconhecimento da bactéria e desencadeiam a sinalização pró-inflamatória [7]. Os receptores TLR2 e TLR4 activam os macrófagos através de cascatas de MAP cinases, Janus cinase/sinal transdutor e activador da transcrição (JAK/STAT) e de NF- $\kappa$ B, culminando na produção de citocinas (nomeadamente IL-1, TNF- $\alpha$  e interferões) e quimiocinas [7] [9] [10]. As células dendríticas são também importantes nesta fase porque são melhores apresentadoras de antígenos que os macrófagos e activam células T com antígenos específicos para *M. tuberculosis* [8] [11]. Estes eventos levam à formação do granuloma, característico desta doença [11]. O granuloma é composto por macrófagos da corrente sanguínea, células epitelióides e células gigantes multinucleadas (células gigantes de Langhans), rodeados por linfócitos T [11]. Este processo é uma forma eficaz de evitar a disseminação da bactéria [8]. À medida que a imunidade celular se desenvolve, os macrófagos com bacilos no seu interior são destruídos, resultando na formação do centro caseoso do granuloma [8]. Apesar de não se conseguirem multiplicar nestas condições adversas, os bacilos podem permanecer quiescentes mas vivos durante décadas [8]. É estabelecida uma

Tuberculose Latente, ou seja, a pessoa é portadora do bacilo mas não desenvolveu a doença, nem a pode transmitir a outros [5].

O bacilo desenvolve várias estratégias para escapar ao sistema imunitário do hospedeiro e sobreviver, nomeadamente evitando a maturação do fagossoma, interferindo na viabilidade do fagócito, regulando a resposta a sinais activadores, secretando factores de virulência, alterando as cascatas de sinalização da célula hospedeira e induzindo a morte de células T [12]. O *M. tuberculosis* demonstrou ser muito resistente a espécies reactivas de oxigénio, como peróxido de hidrogénio ou radicais hidroxilo [7] [13] [14], e expressa genes que contrariam o efeito bactericida e bacteriostático das espécies reactivas nitrogenadas [7]. A maturação do fagossoma é bloqueada através da modificação no recrutamento pela GTPase Rab5 de VPS34, uma fosfatidilinositol 3-cinase de classe III, responsável pela síntese de fosfatidilinositol-fosfato [PI(3)P], sendo esta essencial para a maturação do fagossoma [7] [15] [16]. A supressão pelo *M. tuberculosis* da sinalização mediada pelo cálcio e calmodulina influencia este processo [7] [17]. A secreção de factores de virulência, nomeadamente ESAT-6 (*early secreted antigenic target*) e CFP-10 (*culture filtrate protein 10*), pode estar relacionada com a passagem da micobactéria para o citosol, onde se replica mais rapidamente [7]. As micobactérias patogénicas modulam a actividade da MAP cinase, levando a uma diminuição na resposta pró-inflamatória, por exemplo, através da redução na secreção de citocinas como TNF- $\alpha$  e de óxido nítrico; isto resulta na inibição da apoptose dos macrófagos infectados, um mecanismo de defesa contra *M. tuberculosis* [7]. Por outro lado, a indução da necrose dos macrófagos pela *Mycobacterium* pode ser também um mecanismo de virulência, uma vez que a ruptura da membrana da célula facilita a libertação da bactéria para os tecidos envolventes e a sua consequente disseminação [18] [7]. Estudos mais recentes revelaram que os mecanismos que determinam se o macrófago sofre necrose ou apoptose baseiam-se na sinalização através de PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> [19] [7]. A bactéria virulenta induz a produção de LXA<sub>4</sub>

que suprime a síntese de PGE<sub>2</sub> e leva a necrose do macrófago [19] [7]. Contrariamente, a bactéria não virulenta induz a produção de pequenas quantidades de LXA<sub>4</sub>, produzindo o macrófago infectado maioritariamente PGE<sub>2</sub>, o que resulta na sua apoptose [19] [7]. Outros estudos mostraram que a infecção por formas não virulentas da bactéria permite a reparação da membrana plasmática pela célula hospedeira, enquanto as formas virulentas bloqueiam este processo de reparação, resultando em necrose da célula [20] [7]. Em conclusão, a capacidade do *M. tuberculosis* regular o processo de morte da célula hospedeira representa uma das estratégias mais importantes para escapar ao sistema imunitário do organismo em que se encontra [7].

Se o sistema imunitário não consegue controlar a infecção inicial ou enfraquece devido, nomeadamente, a fármacos imunossupressores, infecção pelo HIV, malnutrição e idade, a bactéria pode voltar a multiplicar-se e disseminar-se, resultando em reactivação da tuberculose [8]. Neste caso, há desenvolvimento de sintomas como tosse, febre e perda de peso [5].

A TB afecta na maior parte das vezes o pulmão, embora possa afectar outros locais do organismo, sendo os gânglios linfáticos, a pleura, os ossos e as articulações os mais frequentes [21]. Os doentes infectados pelo HIV apresentam mais frequentemente TB extrapulmonar, especialmente à medida que a imunossupressão avança [21] [22].

### **Regimes de tratamento da Tuberculose**

Os objectivos do tratamento da TB são: curar o doente, devolvendo-lhe a qualidade de vida; evitar a morte causada pela doença activa ou pelos seus efeitos tardios; prevenir recaídas; reduzir a transmissão; prevenir o desenvolvimento e transmissão de TB resistente [21]. Os

principais fármacos utilizados no tratamento da TB, as doses recomendadas e os principais efeitos adversos encontram-se na Tabela 1.

FÁRMACO	DOSE (ADULTOS) E VIA DE ADMINISTRAÇÃO	PRINCIPAIS REACÇÕES ADVERSAS	ACTIVIDADE PRINCIPAL
<b>Isoniazida (INH)</b>	5 mg/kg (4–6 mg/kg) por dia Via oral	Hepatotoxicidade Neuropatia periférica Hipersensibilidade	Bactericida
<b>Rifampicina (RIF)</b>	10 mg/kg (8–12 mg/kg) por dia ou 3 vezes/semana Via oral	Hepatotoxicidade Gastrointestinais <i>Rash</i> , Prurido Imunológicos (anemia hemolítica, febre, trombocitopenia) Renais (oligúria)	Esterilizante
<b>Pirazinamida (PZN)</b>	25 mg/kg (20–30 mg/kg) por dia Via oral	Hepatotoxicidade Gastrointestinais Hiperuricémia Artralgias	Esterilizante
<b>Etambutol (ETB)</b>	15 mg/kg (15–20 mg/kg) por dia Via oral	Nevrite retrobulbar Nevrite periférica	Prevenção de resistência adquirida
<b>Estreptomicina (S)</b>	15 mg/kg (12–18 mg/kg) por dia, ou 2 ou 3 vezes/semana Via I.M. ou I.V	Locais ( <i>rash</i> , abscesso, dor) Toxicidade vestibular Ototoxicidade Nefrotoxicidade	Bactericida

**Tabela 1** – Doses, vias de administração, acção e efeitos adversos dos principais fármacos utilizados no tratamento da tuberculose (adaptada de *Treatment of drug-resistant tuberculosis*, Pinto *et al.*, 2011 [23] e *Treatment of Tuberculosis Guidelines 4th edition*, World Health Organization, 2010 [21])

Os novos doentes são presumivelmente susceptíveis a todos os fármacos excepto em regiões do globo onde haja uma grande prevalência de resistência a isoniazida (INH) em novos



doentes ou em casos em que o doente esteve em contacto com outro com diagnóstico de TB resistente [21]. O regime de tratamento recomendado consiste numa fase inicial com dois meses de isoniazida, rifampicina (RIF), pirazinamida (PZN) e etambutol (ETB) e uma fase de continuação com quatro meses de isoniazida e rifampicina, num total de 6 meses, sendo recomendadas as combinações com dosagem fixa [21] [24]. A estratégia terapêutica deve ser centrada no paciente, no sentido de maximizar a sua aderência ao tratamento, sendo a toma sob observação directa (TOD), em que o paciente é observado enquanto toma a medicação anti-bacilar, recomendada [25].

A TB extrapulmonar deve ser tratada com o mesmo regime da TB pulmonar, com algumas diferenças em casos específicos [21]. Na meningite tuberculosa é recomendado um tratamento entre nove e doze meses, devido ao grande risco de morte e incapacidade [21] [25] [26]. O etambutol deve ser substituído por estreptomicina (S) [21]. O tratamento da TB de ossos e articulações deve ter a duração de 9 meses, uma vez que é difícil avaliar a resposta ao tratamento [21] [25]. O tratamento adjuvante com corticosteróides é fortemente recomendado nos casos de meningite e pericardite tuberculosas [21] [25] [26].

Muitos dos casos de TB são encontrados em doentes previamente tratados para esta patologia [1] [21]. A falha do tratamento ou recaída após tratamento aparentemente bem-sucedido são factores de risco para resistência do bacilo aos fármacos anti-tuberculosos [24]. Assim, estes doentes devem ser testados pelo menos para resistência a isoniazida e rifampicina, através do teste de susceptibilidade a antibacilares (TSA) [21]. Em regiões onde haja TSA rápido (métodos moleculares), deve esperar-se pelo seu resultado e em seguida decidir o regime terapêutico a instituir [21]. Nos locais onde haja apenas o TSA convencional, ou não seja possível realizar o TSA, deve iniciar-se a terapêutica com dois meses de INH, RIF, PZN, ETB e S, seguidos de um mês com INH, RIF, PZN e ETB e uma fase de continuação com cinco meses de INH, RIF e PZN, num total de 8 meses de tratamento para indivíduos cujo risco de

MDR-TB é baixo ou médio; se o risco de MDR-TB for alto, deve iniciar-se de imediato o regime específico para MDR-TB (abordado adiante) [21]. Assim que os resultados do TSA estejam disponíveis, estes regimes terapêuticos podem ser ajustados [21].

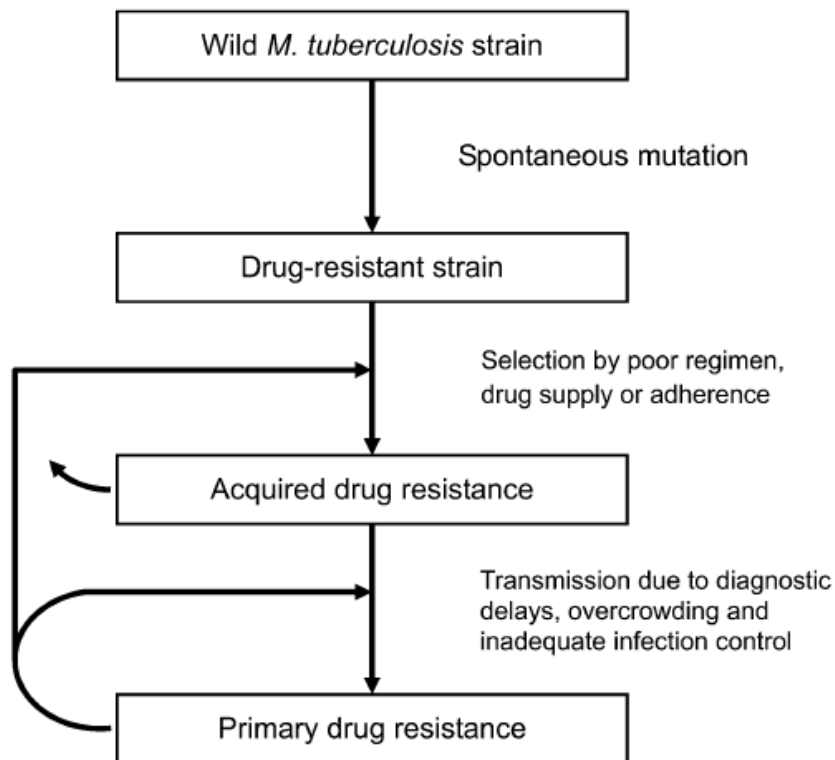
Em casos especiais como doença hepática, doença renal, gravidez e infecção pelo HIV, pode ser necessária a alteração do regime de tratamento *standard*, a alteração da dosagem ou da frequência de administração [24]. Particularizando o caso do HIV, a prioridade nestes doente é iniciar o tratamento para a TB, segundo o regime padrão, seguido de cotrimoxazol (como profilaxia para outras infecções bacterianas) e terapêutica anti-retroviral a começar até oito semanas depois do início do tratamento com anti-tuberculosos [21] [27]. A rifampicina deve ser substituída por rifabutina [21]. A terapêutica anti-retroviral reduz significativamente a morbidade e mortalidade da TB [1].

### **Mecanismos de resistência**

A resistência a um fármaco é definida como uma diminuição da susceptibilidade *in vitro* da bactéria suficiente para a diferenciar de uma estirpe selvagem, que nunca contactou com o fármaco em questão [28]. No caso concreto do *M. tuberculosis*, é definida como a capacidade de mais de 1% dos bacilos para crescer na presença da concentração crítica do fármaco (concentração de antibiótico que inibe o crescimento em 95% das estirpes selvagens até aí nunca expostas ao fármaco) [29]. A resistência pode ser primária, quando está presente num doente sem história de tratamento anti-bacilar prévio, ou adquirida quando é encontrada num doente que recebeu pelo menos um mês de tratamento anti-bacilar prévio [28].

Numa população de *M. tuberculosis*, mutações espontâneas que resultam em resistência a fármacos anti-tuberculosos são pouco frequentes [30]. Mutações nos genes que codificam enzimas que reparam o DNA levam ao aparecimento de cadeias de DNA altamente mutáveis,

o que pode aumentar a taxa de mutação nos genes associados a resistência a fármacos [29]. A resistência a fármacos clinicamente relevante emerge durante o tratamento com fármacos anti-tuberculosos, que impõem uma pressão de selecção numa determinada população de bactérias. Assim, as estirpes mutadas ultrapassam em número as susceptíveis, tornando-se as estirpes dominantes [30]. Estas podem ser transmitidas na comunidade, levando a que os indivíduos infectados por estas estirpes possam desenvolver resistência primária [30].



**Figura 1** – Desenvolvimento de resistência na Tuberculose (retirada de *Mechanisms of drug-resistance in Mycobacterium Tuberculosis*, Zhang *et al.*, 2009 [31])

A TB resistente não é um fenómeno recente; em 1955-1956 foi realizado no Reino Unido o primeiro estudo sobre resistência a fármacos, revelando a existência de resistência primária a estreptomicina, PAS e isoniazida [30].

A resistência a INH é a mais frequente das resistências a fármacos anti-bacilares [31]. O maior factor de risco para o desenvolvimento de monorresistência à INH é o tratamento prévio de TB latente [29]. Esta evidência está relacionada com a grande taxa de mutações nas bactérias mesmo na fase latente da TB, resultado do stress oxidativo, associada ao tratamento da TB latente, que parece contribuir para a emergência de resistência [29]. A INH é um pró-fármaco que necessita de activação pela catalase/peroxidase, enzima codificada pelo gene *katG* [32]. Uma vez activada, a INH interfere com a síntese de ácido micólico, inibindo a enoyl-ACP reductase NADH-dependente, codificada pelo gene *inhA* [32]. Os principais mecanismos de resistência à INH estão associados a mutações nos genes *katG* e *inhA*, ou no seu promotor [32]. As mutações em *inhA* causam também resistência a etionamida, uma vez que esta é estruturalmente semelhante à INH [32]. Mutações nos genes *ahpC*, *kasA* e *ndh* estão também associados a resistência à isoniazida, sendo que as mutações em *ndh* conferem igualmente resistência à etionamida [32]. Por outro lado, foi demonstrado que o tratamento com etambutol em monoterapia pode levar ao aparecimento de resistência à isoniazida [29]. Este facto está relacionado com a existência de bombas de efluxo, que têm a capacidade de transportar moléculas estruturalmente diferentes para fora da bactéria [33]. Assim, um antibiótico pode induzir uma bomba que também transporta outros antibióticos para fora da célula ou alternativamente pode desencadear uma via de sinalização que induza diferentes bombas de efluxo [33]. Estas bombas são uma causa crescente de *M. tuberculosis* resistente a fármacos [33].

A resistência à rifampicina deve-se principalmente a mutações no gene *rpoB* que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase [32]. Isto resulta numa alteração conformacional que determina uma baixa afinidade para o fármaco e consequentemente desenvolvimento de resistência [32]. Quase todas as estirpes resistentes a rifampicina são também resistentes à

isoniazida [32]. A sua detecção tem sido proposta como marcador molecular para a MDR-TB [32].

Mutações no gene *pncA* são o principal mecanismo de resistência à pirazinamida [32]. Este gene codifica a enzima pirazinamidase/nicotinamidase (PZase) que converte a pirazinamida na sua forma activa, o ácido pirazinóico [32]. A resistência ao ETB está muitas vezes associada a mutações no codão 306 do gene *embB*, que codifica a enzima arabinosil transferase [32]. Apesar disso, há uma percentagem importante de estirpes resistentes ao ETB que não apresentam mutações em *embB*, o que mostra que deverá existir um outro mecanismo de resistência ao ETB [32] [31].

Vários estudos mostraram a associação entre a resistência às fluoroquinolonas e mutações nos genes *gyrA* e *gyrB*, que codificam as subunidades A e B da topoisomerase do tipo II do *M. tuberculosis*, único alvo das fluoroquinolonas [32]. Alterações da permeabilidade membranar e expressão aumentada de mecanismos de efluxo estão também associadas a resistência às fluoroquinolonas [32]. Embora seja comum admitir que as fluoroquinolonas apresentam resistência cruzada, foi demonstrado recentemente que uma estirpe com mutação em *gyrB* era resistente à moxifloxacina e à gatifloxacina mas susceptível à ofloxacina [32] [34]. Relativamente aos injectáveis, grandes níveis de resistência a kanamicina e amicacina estão associados a uma mutação A1401G no gene *rrs* que codifica o rRNA [32]. A resistência cruzada entre estes dois fármacos não é absoluta; mutações na região promotora do gene *eis* do *M. tuberculosis* conferem baixos níveis de resistência à kanamicina mas não à amicacina [32]. A resistência à cicloserina pode estar relacionada com a expressão aumentada de *alrA* [32].

### **MDR-TB e XDR-TB – Definição**

As definições dos vários tipos de tuberculose foram estabelecidas no seguimento de focos de resistência que surgiram em algumas zonas do globo. No início dos anos 90, grandes surtos de Tuberculose Multirresistente (MDR-TB) em doentes HIV-positivos foram detectados nos Estados Unidos da América e na Europa, estando associados a grande mortalidade [28]. Esta situação levou a um maior interesse da comunidade internacional para o problema da resistência e da criação em 1994 do Projecto Global para a Vigilância da Resistência aos Anti-tuberculosos pela Organização Mundial de Saúde e a União Internacional contra a Tuberculose e Doenças Pulmonares [28]. No seu primeiro relatório, a multirresistência é definida como resistência a pelo menos Isoniazida e Rifampicina, os dois fármacos mais potentes e a base do tratamento anti-tuberculoso [28].

A tuberculose extensamente resistente (XDR-TB) foi definida pela primeira vez em Março de 2006, para descrever uma forma mais grave da doença [30]. Actualmente, é caracterizada por resistência a Isoniazida e Rifampicina associada a resistência às fluoroquinolonas e a pelo menos um antibacilar injectável (capreomicina, kanamicina e ampicacina) [30].

### **Dados epidemiológicos da Tuberculose Multirresistente (MDR-TB) e da Tuberculose Extensamente Resistente (XDR-TB)**

Em 2011, estimou-se que, entre os 12 milhões de casos de tuberculose a nível mundial, 630 000 correspondiam a Tuberculose Multirresistente (MDR-TB) [1]. 3,7% dos novos casos de tuberculose eram de MDR-TB, sendo a percentagem mais elevada na Bielorrússia (32,3%), Cazaquistão (30,3%), Quirguistão (26,4%), Uzbequistão (23,2%), Estónia (22,9%) e Moldávia (19,4%) [1]. 20% dos casos previamente sujeitos a tratamento tinham MDR-TB, sendo os países ou regiões com maior percentagem de casos a Bielorrússia (75,6% em 2011),

Moldávia (63,5% em 2011), Uzbequistão (62 % em 2011), Estónia (57,7% em 2011), Azerbaijão (Baku, 55,8% em 2007), Tajiquistão (53,6% em 2011) e Cazaquistão (51,3% em 2011) [1]. Na Rússia, apesar da proporção média ter sido mais baixa, a percentagem de casos na região de Arkhangelsk foi elevada com 35,1% de casos de MDR-TB entre os novos casos de tuberculose em 2010 e 58,8% em casos previamente sujeitos a tratamento, em 2008 [1].

A tuberculose extensamente resistente (XDR-TB) foi identificada em 84 países [1]. A proporção de XDR-TB entre os casos de MDR-TB foi de 9%, com proporções mais elevadas no Tajiquistão (cidade de Dushanbe e distrito de Rudaki, 21%), Estónia (18,7%), Lituânia (16,5%), Azerbaijão (Baku, 12,7%), Letónia (12,6%) e Bielorrússia (11,9%) [1].

Em Portugal, a incidência da MDR-TB tem vindo a diminuir, com 1,7% dos casos de TB em 2011 (1,3% nos novos casos e 8,2% nos retratamentos) [2]. O número total de casos de MDR-TB em 2011 foi de 23 casos, 8 dos quais com XDR-TB [2]. Portugal apresenta uma incidência abaixo da média dos países da Europa Ocidental, sendo a região de Lisboa e Vale do Tejo a mais afectada [2].

A percentagem de doentes com MDR-TB que completaram tratamento com sucesso variou de 44% (Região Leste do Mediterrâneo) a 58% (Região do Sudeste Asiático) [1]. A percentagem de mortes foi maior em África (19%) e a percentagem de doentes em que o tratamento falhou foi maior na Europa (12%) [1]. Em geral, a percentagem de tratamentos bem-sucedidos foi de 48% [1]. Em 2008, estimou-se que a MDR-TB tenha causado 150 000 mortes [35]. Os dados mais recentes mostram que a taxa de mortalidade em doentes com MDR-TB é muito maior do que na globalidade dos doentes com TB [1].

### **Factores de risco e associação ao HIV**

Os factores de risco para a MDR-TB podem ser divididos em duas categorias: os que facilitam a selecção de resistência na comunidade e as condições especiais que tornam alguns doentes mais vulneráveis à resistência [36]. Alguns factores de risco contribuíram para a emergência da epidemia em vários países, estando maioritariamente relacionados com o mau funcionamento dos programas nacionais contra a TB: a não implementação da estratégia TOD, a má organização e formação, a falta de fundos, *guidelines* inadequadas, a não utilização de regimes *standard* e a falta de monitorização da terapêutica [36]. Outros factores de risco importantes estão associados à falta de fornecimento de fármacos e a sua baixa qualidade, com doses ou combinações erradas, à toma inadequada da medicação pelos doentes (não aderência ao tratamento, malabsorção de fármacos, efeitos adversos, questões sociais, falta de dinheiro e dependências), à influência do sector privado, ao controlo deficiente da infecção a nível hospitalar e nos centros de saúde, e à grande prevalência de estirpes virulentas de MDR-TB na população [36].

O tratamento prévio com fármacos anti-bacilares é um factor de risco para o desenvolvimento de MDR-TB [35] [30]. Em 2008, 17 países, incluindo Portugal, conduziram um estudo obtendo em separado os resultados de casos de MDR-TB em novos casos de TB e os casos de MDR-TB em doentes previamente tratados. No total dos casos previamente tratados, a probabilidade de encontrar MDR-TB era 5,5 vezes superior à probabilidade de a encontrar no total dos novos casos [35]. Apesar de vários estudos apontarem para maior probabilidade de encontrar MDR-TB nos casos do sexo feminino, o risco de ter MDR-TB não é influenciado pelo sexo do doente [35]. A MDR-TB está associada a idades jovens em países da Europa central e oriental [35] e em Hong-Kong [30] [37]. Outros factores de risco como residentes não permanentes, viajantes frequentes [37] e imigrantes de países com grande prevalência de MDR-TB foram também identificados [30] [36]. Para a XDR-TB, o tratamento prévio e a sua



duração, o número de fármacos de segunda linha recebidos anteriormente, os sem-abrigo e o sexo feminino foram considerados factores de risco [36] [30].

A relação entre o HIV e a MDR-TB não está ainda bem esclarecida [38]. O HIV tem sido associado a casos de MDR-TB em determinados contextos, nomeadamente em hospitais e prisões, mas a nível da comunidade esta associação não é clara [38] [35]. Na Estónia, Letónia e Moldávia, doentes HIV positivos parecem ter maior risco de desenvolver MDR-TB, assim como na Lituânia e na Ucrânia [35]. A maior parte dos estudos da América do Norte mostram uma associação entre a infecção por HIV e a MDR-TB, enquanto em África nenhum a demonstra, excepto resultados preliminares de um estudo em Moçambique que revelaram uma associação significativa [35] [38]. Em Portugal, esta associação foi também descrita, com uma taxa de 44,8% de casos de MDR-TB em 29 indivíduos HIV positivos comparada com uma taxa de 17,7% de casos de MDR-TB em 113 indivíduos não infectados pelo HIV [38]. A resistência à rifampicina e etambutol em doentes com HIV e sujeitos a tratamento com anti-bacilares pode ser devida à malabsorção destes fármacos [35] [38]. As estirpes resistentes são menos virulentas, apresentando estes doentes mais frequentemente baciloscopia negativa e menor probabilidade de transmitir a doença [35] [38]. O diagnóstico tardio leva a uma mortalidade elevada nestes doentes, o que também evita a transmissão da doença [35].

A associação entre o HIV e a MDR-TB pode ser confundida por alguns factores [38]. A doença desenvolve-se mais facilmente nos doentes imunocomprometidos, o que, face à prevalência crescente de resistência, leva a que haja maior percentagem de MDR-TB em doentes com HIV [35] [38]. Da mesma maneira, a associação entre a XDR-TB e a infecção por HIV pode ser resultado da evolução recente da XDR-TB [38]. Os doentes com HIV pertencem frequentemente a populações vulneráveis, incluindo utilizadores de drogas injectáveis, abuso crónico do álcool, populações com problemas socio-comportamentais e

com falta de acesso a cuidados de saúde; esta situação pode levar a falta de aderência à terapêutica ou tratamento sub-ótimo de doentes com TB que, assim, desenvolvem resistências [35] [38]. Além disto, as pessoas com HIV podem estar mais sujeitas a contacto com doentes com MDR-TB, devido ao número aumentado de hospitalizações em locais onde haja um mau controlo da infecção ou em prisões [35] [38].

### **Manifestações clínicas**

A apresentação clínica dos doentes com MDR-TB e XDR-TB é muito variável [30] [39]. Na sua fase inicial, não difere, na maior parte dos casos, da dos doentes com TB susceptível a fármacos [30] [39]. Frequentemente, a MDR-TB pode apresentar-se com envolvimento extrapulmonar e doença progressiva em doentes que efectuaram tratamento prévio com antibióticos [39]. Num estudo canadiano recente, a percentagem de casos de MDR-TB extrapulmonar foi de 14,7%, não diferindo muito da percentagem de casos de TB susceptível extrapulmonar, 15,2% [40]. Em crianças, a doença é avançada e extrapulmonar em mais de 30% dos casos, mas 80% apresentam desfechos favoráveis após tratamento, em oposição aos piores desfechos verificados em adultos. As crianças podem apresentar doença menos grave e com menor número de bacilos, toleram e aderem melhor ao tratamento, e têm menor prevalência de HIV ou de outras co-morbilidades comparativamente aos adultos [41]. A radiografia do tórax não permite a identificação da resistência a *M. tuberculosis* [30] [39].

A TB pulmonar envolve o parênquima pulmonar, enquanto a TB extrapulmonar afecta outros órgãos como os gânglios linfáticos, a pleura, os ossos e as articulações, as meninges, o tracto genito-urinário ou a pele [1]. Um doente com TB pulmonar e extrapulmonar deve ser classificado como um caso de TB pulmonar [1]. Na figura 2 estão alguns dos sinais e sintomas dos diferentes tipos de TB.

Nos pacientes com HIV, a forma mais comum de TB é a TB pulmonar [22]. A apresentação clínica depende do grau de imunossupressão [22]. Se a infecção por HIV é precoce, a TB assemelha-se a uma TB pós-primária; a análise da expectoração é habitualmente positiva e a radiografia de tórax apresenta cavitações [22]. Se a infecção por HIV está numa fase mais avançada, a TB comporta-se como uma TB primária, a análise da expectoração apresenta-se frequentemente negativa e a radiografia de tórax pode apresentar infiltrados, sem cavitações [22]. As formas extrapulmonares e disseminada são mais comuns na TB associada ao HIV, sendo as mais frequentes a TB pleural, TB ganglionar, TB pericárdica, TB miliar, TB meníngea e TB disseminada [22].

<b>Symptoms of Pulmonary and Extrapulmonary TB Disease</b>	
<b>Symptoms of Pulmonary TB Disease</b> (TB disease usually causes one or more of the symptoms)	<b>Symptoms of Possible Extrapulmonary TB Disease</b> (Depends on the part of the body that is affected by the disease)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cough (especially if lasting for 3 weeks or longer) with or without sputum production</li> <li>• Coughing up blood (hemoptysis)</li> <li>• Chest pain</li> <li>• Loss of appetite</li> <li>• Unexplained weight loss</li> <li>• Night sweats</li> <li>• Fever</li> <li>• Fatigue</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TB of the kidney may cause blood in the urine</li> <li>• TB meningitis may cause headache or confusion</li> <li>• TB of the spine may cause back pain</li> <li>• TB of the larynx can cause hoarseness</li> <li>• Loss of appetite</li> <li>• Unexplained weight loss</li> <li>• Night sweats</li> <li>• Fever</li> <li>• Fatigue</li> </ul>

**Figura 2** – Tuberculose: sinais e sintomas (retirado de *Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know*, 5th Edition, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, 2011 [5])

### **Métodos de diagnóstico**

Em 2011, apenas 19% dos 310 000 casos de MDR-TB estimados em doentes com TB pulmonar foram confirmados laboratorialmente [1]. Esta situação deve-se à falta de

capacidade de diagnóstico dos laboratórios, principalmente em países com poucos recursos, e representa um obstáculo ao controlo global da MDR-TB [42].

A primeira abordagem a um caso suspeito de TB é através da microscopia que permite a identificação de bacilos ácido-álcool resistentes, apesar de não distinguir o *M. tuberculosis* de outras micobactérias [42]. A microscopia de luz convencional (técnica de Ziehl Neelsen) pode ser realizada em todos os tipos de laboratório, dos mais periféricos aos nacionais, de referência [42]. A microscopia de fluorescência convencional é mais sensível e obtém resultados mais rapidamente do que a convencional, mas só pode ser efectuada em laboratórios de nível intermédio ou central. A microscopia de díodos emissores de luz (LEDs) é mais barata, tendo a mesma precisão do que a de fluorescência convencional e maior precisão relativamente à microscopia de luz convencional [42]. Assim, a microscopia de LEDs é recomendada como substituta da microscopia de fluorescência convencional e alternativa à microscopia de luz convencional [42].

Para o diagnóstico definitivo da TB é necessário realizar uma cultura e, de seguida, identificar a espécie. A cultura pode ser realizada em meio sólido ou líquido; os meios sólidos são mais baratos mas a obtenção de resultados demora mais tempo (semanas) do que nos meios líquidos (dias) [42]. Estes últimos detectam maior percentagem de casos, mas estão mais sujeitos a contaminação [42]. Os testes imunocromatográficos rápidos para identificação da espécie obtêm resultados em 15 minutos e são recomendados pela OMS [42]. A plataforma LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), para detectar DNA de *M. tuberculosis* em amostras de expectoração não evidenciou resultados suficientes para levar à sua regulamentação [1]. Os testes serológicos comerciais para detecção de antígenos do *M. tuberculosis* não devem ser usados, pois não apresentaram resultados consistentes [1].

Após obtenção de uma cultura positiva, esta deve ser sujeita a teste de susceptibilidade aos anti-bacilares [42]. Este teste só pode ser realizado em laboratórios de nível central, de referência [42]. Deve ser realizado em todos os indivíduos com suspeita de TB, embora em países com poucos recursos seja apenas realizado em indivíduos com factores de risco [43]. Existem métodos fenotípicos e genotípicos para a detecção de resistência a fármacos [42]. Os métodos fenotípicos são considerados o *gold standard* e incluem o método de proporção, o método da concentração absoluta e o método da razão de resistência, todos realizados em meio sólido, e o sistema MGIT (*Bactec mycobacterial growth indicator tube*) e outras plataformas como MBBact, em meio líquido [42] [43]. O sistema MGIT diminui para metade o tempo de obtenção de resultados (de 6-12 semanas para 3-4 semanas), sendo recomendada a sua utilização em países de baixos ou médios rendimentos [43]. Outros métodos fenotípicos alternativos têm sido propostos em vários estudos; a observação microscópica de susceptibilidade a fármacos (MODS) demonstrou excelentes resultados [44], com baixo custo e baixa contaminação em diversos estudos, sendo recomendada pela OMS como teste directo e indirecto para a rápida detecção de MDR-TB [42] [43] [45]. Os métodos colorimétricos indicadores redox (CRI) são recomendados como testes indirectos para a MDR-TB, sendo mais baratos mas com igual tempo de detecção do que o dos métodos convencionais em meio líquido ou testes moleculares LPAs (*line-probe assays*) [42]. O teste da nitrato redutase (NRA) é também recomendado como método directo e indirecto para o diagnóstico de MDR-TB, embora o tempo de obtenção de resultados não seja menor do que o dos métodos convencionais em meio líquido [42] [44]. A evidência existente sobre os métodos bacteriófagos (*phage-based assays*) [46] e a técnica em camada fina de agar (*thin layer agar assay*) [45] demonstrou-se insuficiente para levar à sua recomendação pela OMS [43].

Os métodos genotípicos ou moleculares foram desenvolvidos após sequenciação do genoma do *M. tuberculosis* e identificação de genes associados a resistência [47]. Os avanços recentes

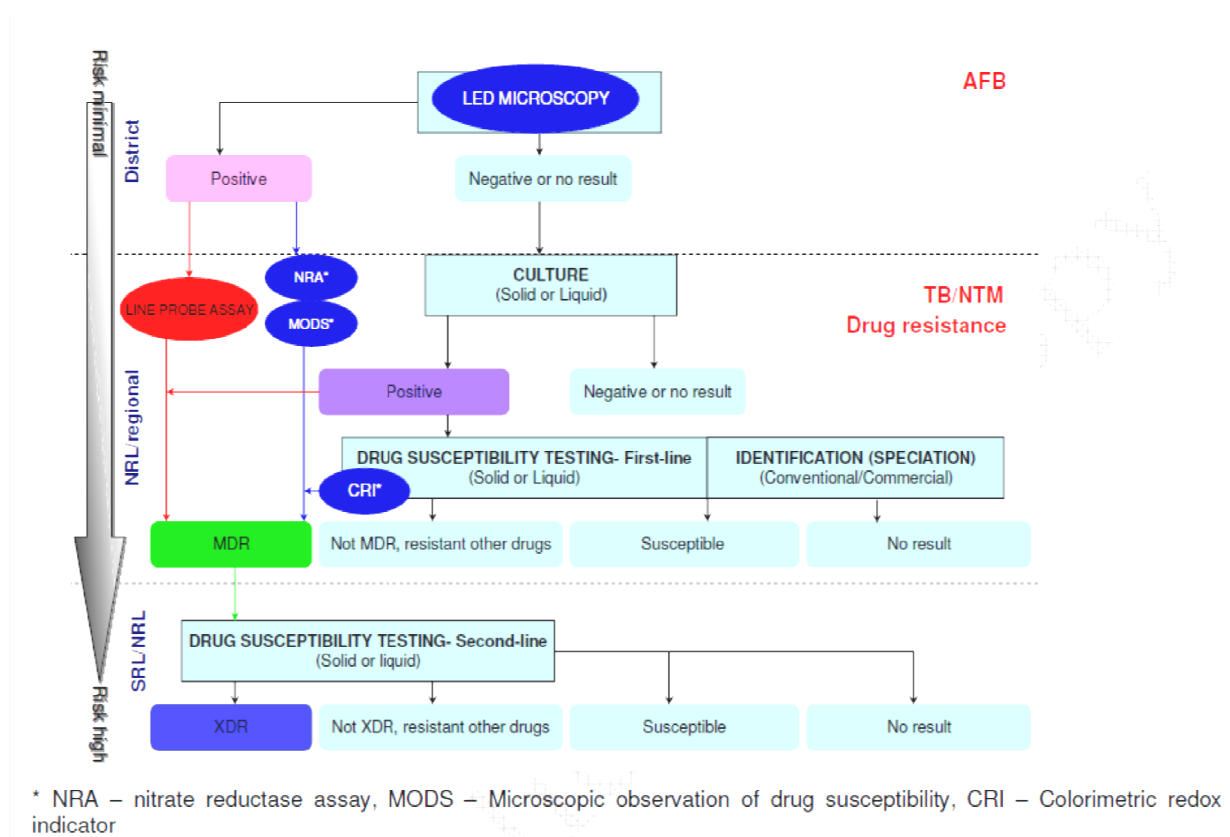
na sequenciação do DNA vão permitir uma sequenciação de todo o genoma de cada uma das estirpes resistentes de uma forma mais rápida e com menos custos [31]. Os LPAs foram aprovados em 2008 para uso em laboratórios centrais de referência, em microscopias ou culturas positivas para *M. tuberculosis* [42]. Os primeiros LPAs disponíveis no mercado foram o INNO-LiPA.RifTB (que detecta mutações no gene *rpoB*, que conferem resistência à RIF) e o GenoTypeMTBDR que detecta, para além de mutações no gene *rpoB*, mutações no gene *katG* que conferem resistência à INH [43] [44]. O novo GenoTypeMTBDRPlus detecta mutações adicionais em *rpoB* e na região promotora do gene *inhA*, apresentando assim maior sensibilidade [43] [44]. Estes métodos consistem na amplificação por PCR, seguida de hibridização com sondas de oligonucleótidos específicas para as mutações mais comuns [43] [48]. São sensíveis, específicos, obtêm resultados em 1-2 dias, são mais baratos e requerem menos condições de segurança laboratorial do que os convencionais [44]. Apesar disso, apresentam algum risco de contaminação e requerem equipamentos sofisticados e pessoal treinado [44]. O método *multiplex allele-specific* (MAS) PCR detecta a resistência a INH através das mutações *inhA* C-15T e *katGS315T*, sendo um método relativamente simples e barato. Obteve resultados comparáveis ao GenoTypeMTBDRPlus na detecção de resistência à INH num estudo realizado na África do Sul [49]. As sondas moleculares de DNA podem ser um excelente método de detecção de resistência quando os genes associados a resistência estão bem definidos e as mutações estão localizadas numa sequência curta de nucleótidos [50].

A tecnologia mais recentemente aprovada é o teste Xpert MTB/RIF que consiste num método automatizado que permite detecção simultânea de TB e de resistência a RIF directamente através de uma amostra de expectoração com resultado num espaço de duas horas [51]. Apresenta grande sensibilidade e especificidade e não requer profissionais muito experientes [43] [51]. Deve ser utilizado como teste diagnóstico inicial em indivíduos suspeitos de ter

MDR-TB ou TB associada a HIV [51]. Pode também ser utilizado após microscopia (especialmente quando esta é negativa) em locais onde a MDR-TB ou o HIV são menos importantes [51]. O TSA de primeira linha é mais preciso para a RIF e INH, e menos fiável e reprodutível para a o ETB, PZN e S [42]. Os sistemas líquidos e os testes moleculares como LPAs (*line-probe assays*) são actualmente o *gold standard* para detecção de resistência a fármacos de primeira linha [42].

O TSA de segunda linha é complexo e caro [42]. Para aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polipeptídeos mostrou ser reprodutível e fiável, permitindo um diagnóstico de qualidade; não é recomendado por rotina para outros fármacos de segunda linha [42]. Os sistemas líquidos são considerados o *gold standard* para o TSA de segunda linha [42]. O método Genotype MTBDRsl, que detecta resistência a fármacos de segunda linha, mostrou uma especificidade alta para detectar resistência a fluoroquinolonas e injectáveis mas uma sensibilidade sub-ótima [1]. Assim o teste poderá ser utilizado como triagem para guiar a estratégia de tratamento inicial, em locais com capacidade de realização e disponibilidade de LPAs, embora não possa ser utilizado como substituto do TSA convencional [1].

A capacidade diagnóstica deve estar ligada ao posterior acesso a fármacos e à capacidade dos programas nacionais para assegurar o tratamento adequado dos doentes [42]. Na figura 3 apresenta-se o algoritmo da OMS para o diagnóstico da TB, com os diferentes métodos recomendados.



**Figura 3** – Algoritmo da OMS para o diagnóstico da Tuberculose (retirado de *Policy Framework for Implementing New Tuberculosis Diagnostics*, World Health Organization, 2010 [42])

Actualmente, o diagnóstico de TB latente causada por estirpes resistentes não é possível [30]. O diagnóstico precoce e a identificação de resistência durante o período de latência do *M. tuberculosis* terá um impacto substancial no controlo da TB [30].

### Tratamento e Prognóstico

As recomendações sobre o tratamento da MDR-TB têm sido frequentemente actualizadas nos últimos anos, sendo que este assunto se reveste de grande complexidade. O tratamento da MDR-TB e XDR-TB baseia-se em fármacos menos potentes, que precisam de ser administrados por maiores períodos de tempo e são bastante mais tóxicos do que os usados no



tratamento da TB susceptível a todos os fármacos, além de muito mais caros [30] [52]. Os vários grupos de fármacos utilizados para tratar a MDR-TB encontram-se na Tabela 2.

<u>Grupo 1:</u> Orais de 1ª linha	Pirazinamida (PZN) Etambutol (ETB) Rifabutina (Rfb)
<u>Grupo 2:</u> Injectáveis	Kanamicina (Km) Amicacina (Am) Capreomicina (Cm) Estreptomicina (S)
<u>Grupo 3:</u> Fluoroquinolonas	Levofloxacina (Lfx) Moxifloxacina (Mfx) Ofloxacina (Ofx)
<u>Grupo 4:</u> Orais de 2ª linha	Ácido Paraminossalicílico (PAS) Etionamida (Eto) Protionamida (Pto) Cicloserina (Cs) Terizidona (Trd)
<u>Grupo 5:</u> Sem eficácia clara no tratamento da MDR-TB	Clofazimina (Cfz) Linezolida (Lzd) Amoxicilina/Ác.clavulânico (Amx/Clv) Tioacetazona (Thz) Isoniazida em alta dose (INH em alta dose) Claritromicina (Clr) Imipenem/cilastatina (Ipm/Cln)

**Tabela 2** – Grupos de Fármacos para tratar a MDR-TB (Adaptada de *Treatment of Tuberculosis Guidelines 4th edition*, World Health Organization, 2010 [21])

As últimas recomendações da OMS para o tratamento da MDR-TB, de 2011, referem que o regime deve incluir pirazinamida, uma fluoroquinolona (excepto a ciprofloxacina), um injectável, etionamida ou protionamida e cicloserina (ou PAS se a cicloserina não puder ser utilizada) [53] [54]. Tendo em conta o preço de cada fármaco, a fluoroquinolona a escolher é a levofloxacina [55]. Relativamente aos injectáveis, a kanamicina é o fármaco de escolha por ser mais barato, podendo ser substituída pela amicacina [53]. A capreomicina é eficaz em casos resistentes à kanamicina [53]. O uso de estreptomicina não é recomendado [53] [55]. O etambutol e os fármacos do grupo 5 podem ser usados mas não fazem parte do regime *standard* [53]. A duração total do tratamento deve ser de 20 meses, sendo que a fase intensiva deve durar 8 meses e incluir a utilização de quatro anti-tuberculosos de segunda linha, assim

como a pirazinamida, que mostrou um benefício adicional nestes doentes [53]. Os doentes devem ser tratados em ambulatório [53] [54]. Um estudo alargado de 2012 mostrou que o regime mais adequado para o tratamento da MDR-TB deve incluir uma quinolona de última geração, etionamida e protionamida [52]. Baseia-se no uso de pelo menos quatro fármacos na fase intensiva inicial, seguida de pelo menos três fármacos na fase de continuação, em doentes que nunca receberam tratamento com fármacos de segunda linha [52]. A duração que está associada a maior sucesso da terapêutica é de 7-8,5 meses para a fase inicial e 25-27 meses de duração total da terapêutica [52]. Apesar disso, regimes mais curtos revelaram-se muito eficazes, num estudo observacional realizado no Bangladesh, com regimes baseados numa fluoroquinolona, kanamicina e protionamida, suplementadas por fármacos de primeira linha ou clofazimina [56]. A clofazimina é uma riminofenazina corante lipossolúvel [57]. Foi desenvolvida em 1950, sendo utilizada para tratamento da lepra, mas a sua utilização na TB foi abandonada devido aos seus efeitos adversos, nomeadamente descoloração da pele e acumulação tecidual de cristais [57]. Com a emergência da MDR-TB, a clofazimina ressurgiu como uma alternativa interessante devido à sua potencial actividade intra e extracelular [55]. Regimes contendo clofazimina têm tido resultados muito positivos em casos de MDR-TB e XDR-TB, merecendo maior investigação [57].

A associação amoxicilina/ácido clavulânico, em combinação com outros fármacos de segunda linha, tem obtido bons resultados no tratamento da MDR-TB [55]. É uma opção barata, com pouca toxicidade e bem tolerada pelo doente [55]. Apesar disto, esta abordagem terapêutica não é muito credível, uma vez que a *M. tuberculosis* é resistente à maior parte dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos *in vitro*, sendo que o papel da amoxicilina/ácido clavulânico não está bem esclarecido [55]. O meropenem e o imipenem mostraram actividade contra *M. tuberculosis in vitro* e eficácia em alguns doentes tratados com estes dois fármacos associados a ácido clavulânico [55]. A pouca experiência clínica, custos elevados, desconhecimento da

toxicidade associada e o facto de estarem apenas disponíveis por via endovenosa restringem a utilização destes fármacos a casos graves [55]. A claritomicina não é muito eficaz contra *M. tuberculosis* [55]. O papel deste fármaco no tratamento da TB não é claro, existindo poucos estudos a seu respeito [55]. As suas únicas vantagens são a boa tolerância e reduzida toxicidade, mas só deve ser utilizada em casos graves quando mais nenhum fármaco está disponível [55]. A tioacetazona é um dos mais antigos, mais baratos e mais usados fármacos no tratamento da TB, apesar da sua actividade ser apenas bacteriostática e, por isso, pouco eficaz [55]. Este fármaco apresenta uma elevada toxicidade, especialmente em pacientes com HIV; nestes doentes nunca deve ser utilizado, devido à alta frequência de síndrome de Stevens-Johnson associado [55]. A utilização deste fármaco deve restringir-se aos casos com um largo espectro de resistências, com um *follow-up* apertado das reacções adversas [55]. Actualmente não é muito utilizado na prática clínica [55].

Os doentes com HIV e MDR-TB devem iniciar terapêutica anti-retroviral, independentemente da contagem de células CD4, nas primeiras 8 semanas após início do tratamento com antibióticos [53]. Quando se inicia a terapêutica anti-retroviral pode ocorrer a síndrome inflamatória de reconstituição imune, que não deve levar à interrupção da terapêutica anti-bacilar e anti-retroviral [54].

Os dados sobre o tratamento específico da XDR-TB são muito limitados [58]. Recomenda-se o uso de fármacos do grupo 1 passíveis de serem eficazes, um fármaco injectável ao qual a bactéria seja susceptível, uma quinolona de última geração como a moxifloxacina, fármacos do grupo 4 que possam ser eficazes e dois ou mais fármacos do grupo 5 [58]. Caso haja um baixo nível de resistência à isoniazida deve ser considerado um regime com altas doses deste fármaco, uma vez que este apresentou resultados positivos em doentes relativamente jovens com MDR-TB [58] [54] [59]. Se a doença for localizada, é de considerar a hipótese de cirurgia adjuvante [58] [60]. A ressecção pulmonar revelou taxas de sucesso elevadas em

doentes com MDR-TB e XDR-TB [61]. Associada à terapêutica farmacológica *standard* (os doentes devem ser tratados durante 3 meses com esta terapêutica antes da cirurgia) mostrou ser eficaz e segura em doentes com XDR-TB localizada [62]. Recentemente, foi também relatado um caso de punção pulmonar percutânea para perfusão de fármacos anti-bacilares directamente na lesão, em doente com XDR-TB, com bons resultados (culturas negativas durante os quatro anos de *follow-up*) [63]. A imunoterapia adjuvante com citocinas ou *M. vaccae* e a suplementação com vitamina D não apresentaram até ao momento evidência clínica suficiente, não tendo um papel definido no tratamento da MDR-TB e XDR-TB [54].

A monitorização apertada é essencial durante o tratamento da MDR-TB [21]. As baciloscopias da expectoração e culturas devem ser realizadas mensalmente até à sua conversão (duas amostras de expectoração negativas consecutivas e duas culturas negativas num espaço de 30 dias) [21]. Após conversão, os doentes devem ser monitorizados com baciloscopia mensalmente e com cultura trimestralmente [21]. As consultas de seguimento devem ser mensais até à conversão e depois a cada 2-3 meses [21]. A terapêutica deve ser mantida pelo menos até 18 meses após conversão da cultura [21].

Novos fármacos apresentam potencial para melhorar o tratamento da MDR-TB e XDR-TB [54]. Dos 11 fármacos em investigação (novos ou em reavaliação), quatro estão em ensaios de fase III (eficácia) e sete em ensaios de fase II (actividade bactericida e conversão da cultura) [1]. Dois dos ensaios em fase III estão a avaliar regimes de 4 meses que substituem uma fluoroquinolona por ETB ou INH [1].

Dos sete ensaios em fase II, a TMC207 (bedaquilina) está a ser testada como componente adicional para otimizar a terapêutica de fundo da MDR-TB [1]. É uma molécula que actua na adenosina trifosfato sintase, levando à síntese inadequada de ATP pela bactéria [57] [64]. Este mecanismo de acção apresenta uma nova abordagem na terapêutica anti-bacilar, podendo

este fármaco ser um aliado contra o aumento crescente de resistências aos fármacos convencionais [57]. A bedaquilina apresentou, em vários estudos, uma potente actividade bactericida e uma rápida conversão das culturas [57]. Os outros seis fármacos em fase II são a linezolida, que foi testada para o tratamento da XDR-TB na dose de 600 mg/dia na Coreia do Sul, a sutezolida (PNU-100480), AZD-5847, PA-824 (um nitro-imidazol) e SQ-109, sintetizado inicialmente como derivado do ETB [1]. Vários estudos defendem o efeito benéfico da linezolida no tratamento de casos difíceis de MDR e XDR-TB [54] [65] [66]. Apesar disto, a linezolida apresenta um custo elevado e uma toxicidade importante, nomeadamente com anemia, trombocitopenia e/ou neuropatia periférica e óptica [55] [57]. Outras oxazolidinonas, como a sutezolida (PNU-100480) e posizolida (AZD-5847), apresentam-se como alternativas à linezolida, esperando-se que tenham menor toxicidade [57]. O PA-824 é um derivado do metronidazol com actividade bactericida contra bactérias susceptíveis e resistentes a fármacos [57]. O seu mecanismo de acção baseia-se na inibição de um componente da parede celular da bactéria e na disrupção da sua cadeia respiratória com produção de óxido nítrico [57]. Quando usado em combinação com pirazinamida e moxifloxacina poderá diminuir a duração do tratamento; efeitos similares foram obtidos para o TMC207 [57] [64]. O SQ109 é um análogo do etambutol que demonstra actividade antibacilar quando usado sozinho ou em associação, podendo a longo prazo aumentar a actividade bactericida de regimes combinados [57]. A delamanida (OPC-67683), derivado do metronidazol, pode ser um substituto para o PA-824, uma vez que partilham o mesmo mecanismo de acção [57]. Está a ser testado como um componente adicional para otimizar a terapêutica de fundo da MDR-TB, tendo avançado para ensaios de fase III em 2011 [1]. O tratamento com delamanida proporciona risco aumentado de prolongamento do intervalo QT assintomático [54]. As benzotiazinonas, uma nova de classe de fármaco descrito em 2009, actuam nas enzimas responsáveis pela formação dos arabinanos, componentes essenciais da

parede celular [57]. Mostraram grande actividade anti-bacilar *in vitro* e *ex vivo*, sendo esta actividade menos evidente *in vivo* [57]. O LL-3858, composto do grupo pirrol, mostrou potente actividade bactericida contra estirpes de *M. tuberculosis* susceptíveis e resistentes a anti-bacilares, em ratos infectados [64]. Está neste momento em ensaios de fase I e tem potencial para diminuir a duração do tratamento [64]. As dinitrobenzamidias, DNB1 e DNB2 têm um mecanismo de acção semelhante e apresentam resistência cruzada com as benzotiazinonas, embora tenham mostrado maior actividade anti-bacilar *in vitro* [57]. As benzotiazinonas e as dinitrobenzamidias estão ainda numa fase de desenvolvimento pré-clínica [57]. As calanolidas são piranocumarinas que parecem ter uma actividade dupla contra a TB e o HIV, encontrando-se igualmente em fase pré-clínica [64].

Um novo regime (NC-001) contendo três fármacos (PA-824, pirazinamida e moxifloxacina) está a obter resultados promissores, com actividade bactericida comparável ao regime *standard* da TB [1]. Foi testado durante dois meses em doentes com TB susceptível a anti-bacilares e em doentes com TB resistente mas susceptível aos anti-bacilares referidos [1]. É o primeiro ensaio que investiga simultaneamente o tratamento da TB susceptível e da TB resistente a anti-bacilares com o mesmo regime terapêutico [1].

O prognóstico a longo prazo dos doentes com MDR-TB teve uma marcada melhoria nos últimos anos com taxas de cura ou conclusão do tratamento entre 33% e 96%, com boa resposta clínica [67]. O prognóstico depende do grau de resistência do *M. tuberculosis*, dos fármacos de segunda e terceira linha disponíveis e da aderência ao tratamento [39]. Os factores de risco para respostas desfavoráveis ao tratamento incluem: atraso no início da terapêutica, tratamento prévio com fármacos anti-bacilares, tratamento prévio com fármacos de segunda linha ou quinolonas, resistência a fluoroquinolonas ou capreomicina, baixo IMC, seropositividade para HIV e imunossupressão [30] [39]. A XDR-TB tem um pior prognóstico e menos opções de tratamento relativamente à MDR-TB [68]. Pacientes com XDR-TB têm

maior probabilidade de morte, falha do tratamento, maior duração de hospitalização e de tratamento e atraso na conversão microbiológica comparados com aqueles com MDR-TB em centros de referência em Itália e na Alemanha [30] [68] [39]. Apesar disso, segundo estudos recentes, a XDR-TB pode ser tratada com sucesso em 50% dos casos [30] [39].

### **Caso clínico**

Doente do sexo masculino, 45 anos, desempregado, ex-toxicodependente (nega o consumo de drogas desde 2001). Foi diagnosticado com TB multirresistente pulmonar e urinária há cinco anos (Novembro de 2008) no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra – Hospital dos Covões, após internamento durante um mês por deterioração do estado geral, tosse e suores nocturnos. Trata-se de um doente HIV positivo desde 1994, com dois episódios de tuberculose anteriores, um em 1996 e outro em 1999 (este último como MDR-TB medicada com ciprofloxacina, cicloserina e etionamida), cujos tratamentos não completou. Outros antecedentes de relevo são uma meningite por *Criptococcus* em 2003, hepatites B e C diagnosticadas em 1994 e hábitos tabágicos desde a adolescência (15 UMA).

Iniciou o esquema terapêutico com PZN, ETB, PAS, levofloxacina e capreomicina. Foi pedido TSA que revelou os seguintes resultados: resistência a S, INH, RIF, capreomicina, etionamida e ofloxacina, e sensibilidade a ETB, PZN, amicacina e canamicina. A TB apresentava-se já como TB extensamente resistente (XDR-TB) e a terapêutica foi alterada, passando a um esquema com PZN, ETB, PAS e amicacina. O paciente teve alta e passou a ser acompanhado no Centro de Diagnóstico Pneumológico de Coimbra, em regime TOD. No primeiro mês após início do tratamento referiu dor na região nadegueira devido às injeções intramusculares de amicacina, motivo pelo qual passou a ser medicado com amicacina endovenosa, sem alteração da restante terapêutica. Manteve seguimento mensal com

baciloscopias e culturas negativas, e de dois em dois meses realizou radiografia do tórax (esta revelou apenas imagens sequelares nos terços superiores de ambos os campos pulmonares). Em Março de 2009, 5 meses após início da terapêutica, deixou de comparecer à TOD, não tendo tomado a medicação durante uns dias. Um mês depois, seis após início da terapêutica, a análise bacteriológica da urina foi positiva para BK. O antibiograma revelou resistência a INH, RIF, PZN e ETB, capreomicina, canamicina, ofloxacina e etionamida, e sensibilidade a PAS e amicacina. A cultura de urina manteve-se positiva no sétimo mês após o início da terapêutica. Em Julho de 2009, com 9 meses de tratamento, foi novamente internado no durante um mês no Hospital dos Covões. Apresentava-se imunologicamente deprimido, com astenia, náuseas, perda de peso (6 Kg em 3 semanas), diminuição da força muscular e tonturas. Não se encontrava a fazer terapêutica anti-retroviral. A urocultura e a pesquisa de micobactérias nas fezes foram positivas. O esquema terapêutico foi alterado para PZN (3 cápsulas i.d.), PAS (16 comprimidos i.d.) e linezolida (1 comprimido 12/12 h) e foi iniciada terapêutica anti-retroviral. Aos 11 meses de tratamento, a urocultura apresentou resultado negativo. Desde essa altura até ao 27º mês após início da terapêutica, o doente cumpriu a terapêutica em regime TOD, tendo tido sempre baciloscopias e culturas negativas. Ao 27º mês de tratamento, em Fevereiro de 2011, foi internado no Hospital dos Covões por toracalgia, tosse e mal-estar geral. Apresentava anemia, leucopenia e trombocitopenia e uma baciloscopia da expectoração positiva. Confessou na altura ter suspenso a toma da medicação à noite devido a episódios de diarreia e encontrava-se emocionalmente instável. Teve alta cerca de um mês depois, após obtenção de três baciloscopias negativas. Foi medicado com capreomicina (1g em dias alternados), cicloserina (500 mg 12/12h), etionamida (250 mg i.d.), levofloxacina (750 mg i.d.), amoxicilina/ácido clavulânico (1 g 12/12h) e pirazinamida (1500 mg i.d.), além da terapêutica anti-retroviral. Foram pedidos TSA de primeira e segunda linhas com os seguintes resultados: resistência a RIF, INH, PZN, ETB, S, amicacina, capreomicina,



canamicina, ofloxacina e etionamida, e sensibilidade a linezolida, cicloserina e PAS. Em Abril de 2011, no 29º mês de terapêutica, apresentou baciloscopia negativa, mas cultura em meio líquido positiva. De acordo com os resultados do TSA, introduziu-se no regime terapêutico linezolida (1 comprimido 12/12h). Começou a ser apoiado por uma associação local, que acompanhou a TOD no domicílio do doente. Cumpriu a terapêutica, com melhoria do estado geral, recuperação de perda ponderal e diminuição da astenia. As baciloscopias e culturas foram negativas e a radiografia de tórax manteve-se inalterada. Ao 34º mês de terapêutica apresentou parestesias dos membros inferiores, o que levou à prescrição de piridoxina (120 mg) e redução da linezolida para 1 comprimido i.d. A restante terapêutica manteve-se. Ao 36º mês de terapêutica, foi-lhe detectada uma diminuição marcada da acuidade visual, razão pela qual suspendeu a linezolida. Até ao 42º mês, manteve-se estável com baciloscopias e culturas negativas, e radiografia torácica inalterada. Nessa altura, 4/5/2012, completou 18 meses de tratamento após a cultura negativa, passando apenas a vigilância. A duração total do tratamento foi de 42 meses. Nas consultas de vigilância dos três meses seguintes, manteve-se assintomático, com uma radiografia inalterada.

## Conclusões/Perspectivas

A tuberculose multirresistente e a tuberculose extensamente resistente mantêm níveis preocupantes nalgumas regiões, com taxas de mortalidade elevadas [1]. Apesar do grande número de casos de MDR-TB notificados nos últimos anos, este parece ser ainda muito inferior ao número real de casos [1]. Os novos métodos diagnósticos podem tornar a detecção de resistência mais rápida e eficaz, mas é essencial garantir que o método de diagnóstico é adequado à capacidade laboratorial do local em questão e à experiência dos profissionais que o utilizam [42]. O tratamento prévio com fármacos anti-bacilares é um factor de risco importante para o desenvolvimento de MDR-TB [30] [35]. Os programas nacionais contra a TB que utilizem os fármacos disponíveis de uma forma eficaz podem adiar ou mesmo reverter a epidemia de MDR-TB [36]. Por outro lado, os novos fármacos, regimes e abordagens terapêuticas para a MDR-TB devem ser alvo de mais estudos clínicos englobando maior número de pacientes em diferentes locais do globo; a eficácia, a toxicidade e o preço devem ser considerados na construção de melhores regimes terapêuticos adaptados para países com mais e menos recursos [1]. Finalmente, a relação entre o HIV e a MDR-TB e XDR-TB deve ser alvo de maior investigação para travar uma epidemia de HIV/MDR-TB [38].

## Bibliografia

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2012. 2012.
- [2] Direcção Geral de Saúde. Relatório para o Dia Mundial da Tuberculose. 2012.
- [3] World Health Organization and European Centre for Disease Prevention and Control. Tuberculosis surveillance and Monitoring in Europe. 2012.
- [4] World Health Organization. Tuberculosis country profiles [Online]. Available: [www.who.int/tb/data](http://www.who.int/tb/data). [Accessed November 2012].
- [5] Centers for Disease Control and Prevention/ National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention - Division of Tuberculosis Elimination. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician should Know, 5th Edition; 2011.
- [6] Vasconcellos SG, Huard RC, Niemann S, Kremer K, Santos AR, Suffys PN, et al. Distinct genotypic profiles of the two major clades of *Mycobacterium africanum*. *BMC Infectious Diseases*.2010;10.
- [7] Jordão L, Vieira OV. Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease. *International Journal of Cell Biology*.2011; 2011:13.
- [8] Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*.2003;16:463-496.
- [9] Bowdish DME, Sakamoto K, Kim MIJ et al. MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*.2009;5.
- [10] Jo EK, Yang CS, Choi CH, Harding CV. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to *Mycobacteria*: branching out from Toll-like receptors. *Cellular Microbiology*.2007;9:1087–1098.
- [11] Silva MM, Breiman A, Allain S, Deknuydt F, Altare F. The Tuberculous Granuloma: An Unsuccessful Host Defence Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria?. *Clinical and Developmental Immunology*.2012;2012.
- [12] Macdonald SHF, Woodward E, Coleman MM, Dorris ER, Nadarajan P, Chew WM, et al. Networked T Cell Death following Macrophage Infection by *Mycobacterium Tuberculosis*.*PLoS ONE*.2012; 7.
- [13] Jordao L, Bleck CKE, Mayorga L, Griffiths G, Anes E. On the killing of mycobacteria by macrophages.*Cellular Microbiology*.2008;10:529–548.
- [14] O'Brien S, Andrew PW. Guinea-pig alveolar macrophage killing of *Mycobacterium tuberculosis*, in vitro, does not require hydrogen peroxide or hydroxyl radical. *Microbial*

- Pathogenesis.1991;11:229–236.
- [15] Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *Journal of Cell Biology*.2001;154:631–644.
- [16] Vieira OV, Botelho RJ, Rameh L et al. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation.*The Journal of Cell Biology*.2001;155:19–25.
- [17] Malik AZ, Denning MG, Kusner DJ. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> Signaling by Mycobacterium tuberculosis Is Associated with Reduced Phagosome–Lysosome Fusion and Increased Survival within Human Macrophages.*Journal of Experimental Medicine*.2000;191:287–302.
- [18] Chen M, Gan H, Remold HG. A mechanism of virulence: virulent Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis.*The Journal of Immunology*.2006;176:3707–3716.
- [19] Chen M, Divangahi M, Gan H et al. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE and LXA in the induction of macrophage death. *Journal of Experimental Medicine*.2008;205:2791–2801.
- [20] Divangahi M, Chen M, Gan H, DeJardins D, Hickman TT. Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nature Immunology*.2009;10:899–906.
- [21] World Health Organization. Treatment of Tuberculosis Guidelines.4<sup>th</sup> Edition. 2010.
- [22] World Health Organization. TB/HIV: a clinical manual. 2<sup>nd</sup> Edition. Geneva, 2004.
- [23] Pinto L, Menzies D. Treatment of drug-resistant tuberculosis. *Infection and Drug Resistance*.2011; 4:129-135.
- [24] Tuberculosis Coalition for Technical Assistance (TBCTA).International Standards for Tuberculosis Care, 2nd Edition. 2009.
- [25] American Thoracic Society, CDC, Infectious Diseases Society of America. MMWR Recommendations and Reports: Treatment of Tuberculosis. 2003.
- [26] National Collaborating Centre for Chronic Conditions (UK), Centre for Clinical Practice at NICE (UK).Tuberculosis: Clinical Diagnosis and Management of Tuberculosis, and Measures for Its Prevention and Control.2011.
- [27] Harries AD, Zachariah R, Lawn SD. Providing HIV care for co-infected tuberculosis patients: a perspective from sub-Saharan Africa. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*.2009;13:6-16.
- [28] World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World.1994-1997.

- [29] Pasipanodya JG, Gumbo T. A new evolutionary and pharmacokinetic-pharmacodynamic scenario for rapid emergence of resistance to single and multiple anti-tuberculosis drugs. *Current Opinion in Pharmacology*. 2011;11(5):457–463.
- [30] Chiang CY, Centis R, Migliori GB. Drug-resistant tuberculosis: Past, present, future. *Respirology*. 2010;15:413-432.
- [31] Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(11):1320-1330.
- [32] Da Silva PEA, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:1417-1430.
- [33] Srivastava S, Musuka S, Sherman C, Meek C, Leff R, Gumbo T. Efflux-Pump–Derived Multiple Drug Resistance to Ethambutol Monotherapy in *Mycobacterium tuberculosis* and the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ethambutol. *J Infect Dis*. 2010;201:1225–1231.
- [34] Von Groll A, Martin A, Jureen P, Hoffner S, Vandamme P, Portaels F, et al. Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:4498-4500.
- [35] World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) - Global Report on Surveillance and Response 2010. 2010.
- [36] Caminero, JA. Multidrug-resistant tuberculosis: epidemiology, risk factors and case finding. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14(4):382–390.
- [37] Law WS, Yew WW, Chiu Leung C, Kam KM, Tam CM, Chan CK, et al. Risk factors for multidrug-resistant tuberculosis in Hong Kong. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12(9):1065-70.
- [38] Suchindran S, Brouwer ES, Van Rie A. Is HIV Infection a Risk Factor for Multi-Drug Resistant Tuberculosis? A Systematic Review. *PLoS One*. 2009;4.
- [39] Migliori GB, Richardson M, Sotgiu G, Lange C. Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in the West Europe and United States: Epidemiology, Surveillance, and Control. *Clin Chest Med*. 2009;30:637–665.
- [40] Minion J, Gallant V, Wolfe J, Jamieson F, Long R. Multidrug and Extensively Drug-resistant Tuberculosis in Canada 1997–2008: Demographic and Disease Characteristics. *PLOS ONE*. 2013;8
- [41] Seddon JA, Hesselning AC, Willemsse M, Donald PR, Schaaf HS. Culture-Confirmed Multidrug-Resistant Tuberculosis in Children: Clinical Features, Treatment, and Outcome, *Clinical Infectious Diseases*. 2012;54(2):157-166.
- [42] World Health Organization. Policy framework for Implementing New Tuberculosis Diagnostics. 2010.

- [43] Moore DAJ, Shah NS. Alternative Methods of Diagnosing Drug Resistance - What Can They Do for Me?. *The Journal of Infectious Diseases*.2011;204:1110-1119.
- [44] Bwanga F, Hoffner S, Haile M, Joloba ML. Direct susceptibility testing for multidrug resistant tuberculosis: A meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*.2009;9.
- [45] Minion J, Leung E, Menzies D, Pai M. Microscopic-observation drug susceptibility and thin layer agar assays for the detection of drug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*.2010;10:688–98.
- [46] Minion J, Pai M. Bacteriophage assays for rifampicin resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: updated meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*.2010;14(8):941-951.
- [47] Córdoba BC, Cuevas RZ. Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. *Efermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.2010;28(9):621–628.
- [48] World Health Organization. Molecular Line Probe Assays for rapid screening of patients at risk of Multidrug-resistant Tuberculosis (MDR-TB). 2008. [Online].
- [49] Evans J, Stead MC, Nicol MP, Segal H. Rapid genotypic assays to identify drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.2009;63:11-16.
- [50] Lin SYG, Probert W, Lo M, Desmond E. Rapid Detection of Isoniazid and Rifampin Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Cultures or Smear-Positive Sputa by Use of Molecular Beacons. *Journal of Clinical Microbiology*.2004;42:4204–4208.
- [51] World Health Organization. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. 2011.
- [52] Collaborative Group for Meta-Analysis of Individual Patient Data in MDR-TB. Multidrug Resistant Pulmonary Tuberculosis Treatment Regimens and Patient Outcomes: An Individual Patient Data Meta-analysis of 9,153 Patients. *PLOS Medicine*.2012; 9.
- [53] World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, 2011 update. 2011.
- [54] KC Chang, Yew WW. Management of difficult multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: Update 2012. *Respirology*.2012;18:8-21.
- [55] Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2010;10:621-29.
- [56] Van Deun A, Maug AKJ, Salim MAH, Pankaj KD, Mihir RS, Daru P, et al. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.2010;182:684–692.

- [57] Grosset JH, Singer TG, Bishai WR. New drugs for the treatment of tuberculosis: hope and reality. 2012. *Intl J Tuberc Lung Dis*;16(8):1005-1014.
- [58] World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: emergency update 2008. 2008.
- [59] Katiyar SK, Bihari S, Prakash S, et al. A randomised controlled trial of high-dose isoniazid adjuvant therapy for multidrug-resistant tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2008;12:139-45.
- [60] Törün T, Tahaog˘lu K, Ozmen I, et al. The role of surgery and fluoroquinolones in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2007;11:979-85.
- [61] Hong-Bin X, Rui-Hua J, Ling L. Pulmonary resection for patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66:1687-1695.
- [62] Shiraishi Y, Katsuragi N, Kita H, et al. Experience with pulmonary resection for extensively drug-resistant tuberculosis. *Interactive Cardiovascular Thoracic Surgery*. 2008;7:1075-8.
- [63] Shu-Hua Y, Ping Z, Mei S, Ya-Ping Z, Nan-Lan M. Perfusing chemotherapy by percutaneous lung puncture in the treatment of extensive drug resistant pulmonary tuberculosis. *Journal of Thoracic Disease*. 2012;4:624-628.
- [64] Gothi D, Joshi JM. Resistant TB: Newer Drugs and Community Approach. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 2011;6:27-37.
- [65] Sotgiu G, Centis R, D'Ambrosio L, et al. Efficacy, safety and tolerability of linezolid containing regimens in treating MDR-TB and XDR-TB: systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*. 2012.
- [66] Cox H, Ford N. Linezolid for the treatment of complicated drug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2012;16:447-54.
- [67] Schaaf HS, Moll AP, Dheda K. Tuberculosis in Africa and South America: Epidemiology, Diagnosis and Management in Adults and Children. *Clin Chest Med*. 2009;30:667-683.
- [68] Sotgiu G, Ferrara G, Matteelli A, Richardson MD, Centis R, Ruesch-Gerdes S, et al. Epidemiology and clinical management of XDR-TB: a systematic review by TBNET. *Eur Respir J*. 2009;33:871-881.