

Recomendações técnicas para
laudo e interpretação do
teste de hibridização com
sonda em linha
(*Line Probe Assay – LPA*)
para tuberculose



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente
Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e
Infecções Sexualmente Transmissíveis

Recomendações técnicas para
laudo e interpretação do
teste de hibridização com
sonda em linha
(*Line Probe Assay – LPA*)
para tuberculose



Brasília - DF
2023

2023 Ministério da Saúde.



Esta obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: bvsms.saude.gov.br.

Tiragem: 1ª edição – 2023 – versão eletrônica

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente
Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis
Coordenação-Geral de Vigilância da Tuberculose, Micoses Endêmicas e Micobactérias Não Tuberculosas
SRTVN, quadra 701, via W5 Norte, lote D, Edifício PO 700, 5º andar
CEP 70.719-040 – Brasília/DF
Tel: (61) 3315-2787
Site: <https://www.gov.br/aids/pt-br/assuntos/tuberculose>
E-mail: tuberculose@saude.gov.br

Projeto gráfico e diagramação:

Marcos Cleuton de Oliveira
Wilfred Dominique Ferreira Nunes

Normalização:

Delano de Aquino Silva – Editora MS/CGDI

Coordenação-geral:

Angélica Espinosa Barbosa Miranda – CGIST/Dathi/SVSA/MS
Draurio Barreira – Dathi/SVSA/MS
Fernanda Dockhorn Costa Johansen – CGTM/Dathi/SVSA/MS
Helena Cristina Ferreira Franz – CGLAB/Daevs/SVSA/MS

Organização:

Daniele Gomes Dell’Orti – CGTM/Dathi/SVSA/MS
Eduardo de Souza Alves – CGTM/Dathi/SVSA/MS
Fernanda Dockhorn Costa Johansen – CGTM/Dathi/SVSA/MS
Nicole Menezes de Souza – CGTM/Dathi/SVSA/MS

Colaboração:

Artemir Coelho de Brito – CGTM/Dathi/SVSA/MS
Helena Cristina Ferreira Franz – CGLAB/Daevs/SVSA/MS
Karen Machado Gomes – CGLAB/Daevs/SVSA/MA
Selma Lina Suzuki Akabane – CGLAB/Daevs/SVSA/MS
Simone Gonçalves Senna – CGLAB/Daevs/SVSA/MA

Revisão ortográfica:

Angela Gasperin Martinazzo

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis.

Recomendações Técnicas para Laudo e Interpretação do Teste de Hibridização com Sonda em Linha (*Line Probe Assay* – LPA) para Tuberculose [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2023.

26 p. : il.

Modo de acesso: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/recomendacoes_laudo_interpretacao_teste_hibridizacao.pdf
ISBN 978-65-5993-473-7

1. Tuberculose. 2. Diagnóstico. 3. Saúde Pública. I. Título.

CDU 616-002.5

Catálogo na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2023/0237

Título para indexação:

Technical Recommendations for Report and Interpretation of the Line Probe Assay – LPA for Tuberculosis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fluxograma de uso do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) em amostras de pessoas com suspeita de tuberculose pulmonar com resultado no TRM-TB “MTB Detectado” e sem resistência à rifampicina ou com resultado positivo na baciloscopia **13**
- Figura 2** Fluxograma de uso do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) em amostras de pessoas com suspeita de tuberculose pulmonar com resultado no TRM-TB “MTB Detectado” e com resistência à rifampicina **14**
- Figura 3** Fluxograma de uso do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) em amostras de pessoas com tuberculose drogarresistente aos fármacos de 1ª linha **15**
- Figura 4** Fluxograma laboratorial de uso do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) **19**



LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Resultados e interpretações dos laudos referentes ao teste de hibridização com sonda em linha (LPA) de 1ª linha	9
Quadro 2	Resultados e interpretações dos laudos referentes ao teste de hibridização com sonda em linha (LPA) de 2ª linha	10
Quadro 3	Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo do gene <i>rpoB</i> (rifampicina).....	20
Quadro 4	Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo dos genes <i>inhA</i> e <i>katG</i> (isoniazida e etionamida).....	21
Quadro 5	Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo do gene <i>gyrA</i> (levofloxacino e moxifloxacino)	22
Quadro 6	Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo do gene <i>gyrB</i> (levofloxacino e moxifloxacino)	23
Quadro 7	Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo do gene <i>rrs</i> (amicacina).....	23
Quadro 8	Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo do gene <i>eis</i> (amicacina)	24



LISTA DE SIGLAS

AC	Controle de amplificação
CC	Controle do conjugado
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CSB	Cabine de segurança biológica
EPI	Equipamentos de proteção individual
GAL	Sistema de Gerenciamento de Ambiente Laboratorial
LPA	Teste de hibridização com sonda em linha (<i>Line Probe Assay</i>)
MGIT	Tubo indicador de crescimento de micobactérias
MNT	Micobactéria não tuberculosa
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCC	Ponto de corte clínico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TB DR	Tuberculose drogarresistente
TRM-TB	Teste rápido molecular para tuberculose
TS	Testes de sensibilidade



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 PARTE I – ASSISTÊNCIA	8
2.1 O teste de hibridização com sonda em linha	8
2.2 Indicação de uso do LPA.....	8
2.3 Amostras biológicas para o diagnóstico de resistência no LPA.....	8
2.4 Resultados obtidos no LPA	9
2.5 Considerações importantes.....	11
3 PARTE II – LABORATÓRIO	16
3.1 Princípio do método.....	16
3.2 Biossegurança	16
3.3 Armazenamento e transporte	18
3.4 Considerações importantes.....	18
3.5 Interpretação laboratorial para emissão dos laudos.....	18
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

O teste de hibridização com sonda em linha (do inglês *Line Probe Assay* – LPA) é um teste molecular baseado na amplificação de ácidos nucleicos para a identificação do complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e de mutações relacionadas à resistência aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose (TB)¹⁻³.

O LPA para fármacos de 1ª linha foi recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2008; já a recomendação do ensaio para fármacos de 2ª linha ocorreu em 2016. Ambos os testes foram incorporados ao Sistema Único de Saúde (SUS) em 2021, por meio da Portaria n.º 43, publicada no Diário Oficial da União n.º 127, seção 1, página 144, em 8 de julho de 2021⁴⁻⁶.

O presente documento é composto por duas partes, a primeira voltada aos profissionais da assistência à pessoa com TB e a segunda aos profissionais de saúde envolvidos no diagnóstico laboratorial da doença, e contém informações para apoiar as seguintes atividades:

- 1) interpretações dos resultados emitidos nos laudos laboratoriais e associação de resistência com as mutações detectadas;
- 2) recomendações de manejo da pessoa com TB e diagnóstico de resistência por meio da técnica de LPA;
- 3) ações para fluxo de diagnóstico laboratorial por meio do LPA;
- 4) recomendações para liberação do laudo, conforme o Sistema de Gerenciamento de Ambiente Laboratorial (GAL).

O LPA não irá substituir as técnicas já implementadas, mas sim compor a cascata de diagnóstico como ferramenta importante para a detecção de TB drogarresistente (TB DR). Importante destacar que o diagnóstico inicial de casos novos de TB pulmonar e extrapulmonar deve ser realizado, prioritariamente, pelo teste rápido molecular para TB (TRM-TB). Nesse contexto, o LPA se apresenta como alternativa para a triagem de resistência além da rifampicina.

2 PARTE I – ASSISTÊNCIA

2.1 O teste de hibridização com sonda em linha

Os testes de sensibilidade (TS) são fundamentais para que, após o diagnóstico laboratorial inicial de TB, realizado por meio de TRM-TB ou baciloscopia, sejam detectadas possíveis resistências aos medicamentos utilizados no tratamento da doença.

Os TS podem ser realizados por métodos fenotípicos e genotípicos; entretanto, os métodos genotípicos viabilizam um diagnóstico mais rápido, principalmente quando executados diretamente a partir de amostras clínicas, o que promove um aprimoramento da vigilância da doença e do cuidado à pessoa com TB, permitindo o início rápido e oportuno do tratamento.

O LPA é considerado um TS genotípico capaz de identificar as bactérias do CMTB e de detectar, simultaneamente, mutações em genes específicos, sabidamente conhecidos pela relação de ocorrência do fenômeno de resistência aos principais fármacos utilizados no tratamento para TB, como a rifampicina, a isoniazida e a etionamida no LPA de 1ª linha e as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos/peptídeos cíclicos no LPA de 2ª linha.

2.2 Indicação de uso do LPA

O LPA está indicado para a detecção de resistência aos fármacos utilizados no tratamento da TB. Recomenda-se a realização do exame em **todas as pessoas diagnosticadas com TB**. Se o TRM-TB tiver como resultado “MTB Detectado” (exceto com resultados “*very low*” e “traços”) ou baciloscopia positiva (pelo menos 1+), o LPA pode ser realizado diretamente a partir de amostra de escarro.

Entretanto, as populações a seguir listadas devem ser priorizadas, uma vez que são diretamente beneficiadas por esse diagnóstico rápido da resistência antimicrobiana:

- 1) pessoas com resistência à rifampicina detectada no TRM-TB;
- 2) pessoas em retratamento de TB;
- 3) pessoas com sinais e sintomas de TB e histórico de contato com pessoa(s) com TB DR;
- 4) pessoas com baciloscopia positiva no 2º mês de acompanhamento de tratamento;
- 5) pessoas que apresentam falência ao tratamento com esquema básico;
- 6) pessoas com suspeita de resistência, em qualquer momento do tratamento.

2.3 Amostras biológicas para o diagnóstico de resistência no LPA

O LPA pode ser realizado a partir de amostra de escarro, no intuito de oportunizar o tempo para a liberação do resultado laboratorial. Para a realização do exame diretamente sobre a amostra de escarro, é necessário ter um resultado prévio **positivo** de:

- 1) TRM-TB com resultado “MTB Detectado”, exceto para aqueles que indicam “*very low*”; ou “traços”; ou
- 2) baciloscopia **positiva, com no mínimo 1+**.

Importante destacar que a amostra precisa ser encaminhada ao laboratório executor em até quatro dias após a coleta.

Já no caso de outras amostras pulmonares ou extrapulmonares, devido à escassez de dados referentes à acurácia do teste, a **indicação é realizar o LPA somente a partir do isolado de cultura**.

O laboratório deverá verificar o volume mínimo necessário para a realização dos testes e, em caso de não obtenção desse volume, poderá solicitar nova coleta.

2.4 Resultados obtidos no LPA

De forma geral, há quatro possíveis resultados no LPA:

- 1) **Mutação detectada:** presença de ligação com uma ou mais sondas referentes às mutações mais comumente associadas aos casos de resistência e que são detectadas pelo teste.
- 2) **Mutação não detectada:** ausência de ligação com as sondas das mutações mais comumente associadas aos casos de resistência detectadas pelo teste e presença de ligação com as sondas da cepa selvagem.
- 3) **Mutação inferida:** ausência de ligação com as sondas das mutações associadas à resistência e, também, ausência de ligação com as sondas da cepa selvagem. Infere-se que há alguma mutação, mas esta não é definida pelo teste.
- 4) **Mutação indeterminada:** devido à ausência de algumas bandas específicas, avaliadas pelo laboratório, o resultado se torna inválido/indeterminado.

A seguir são apresentados os resultados dos exames e suas interpretações, a depender da mutação detectada:

Quadro 1 Resultados e interpretações dos laudos referentes ao teste de hibridização com sonda em linha (LPA) de 1ª linha

RESULTADO	INTERPRETAÇÃO	RECOMENDAÇÃO
Mutação NÃO detectada	→ Resistência não detectada; → A isoniazida e rifampicina são eficazes.	Iniciar esquema básico de tratamento. Em caso de forte suspeita de TB DR, recomenda-se avaliar clinicamente o caso e considerar o TS fenotípico para isoniazida, para exclusão de resistências em outros genes não abarcados pelo teste.
Mutação indeterminada	→ Resultado inconclusivo.	Recomenda-se realizar TS fenotípico.
Mutação detectada no gene <i>inhA</i>	→ Resistência de baixo nível à isoniazida detectada. A isoniazida pode ser eficaz em altas doses; → Resistência à etionamida detectada. A etionamida não é eficaz.	Iniciar esquema para TB DR conforme perfil de resistência. Recomenda-se encaminhar para TS de 2ª linha.
Mutação inferida no gene <i>inhA</i>	→ Resistência de baixo nível à isoniazida inferida. A isoniazida pode ser eficaz em altas doses; → Resistência à etionamida inferida. A etionamida provavelmente não é eficaz.	Avaliar o esquema para TB DR conforme perfil de resistência. Recomenda-se encaminhar para TS fenotípico de isoniazida e TS de 2ª linha.

continua

conclusão

RESULTADO	INTERPRETAÇÃO	RECOMENDAÇÃO
Mutação detectada no gene <i>katG</i>	→ Resistência à isoniazida detectada; → A isoniazida não é eficaz, mesmo em doses altas.	Avaliar esquema para TB DR conforme perfil de resistência. Recomenda-se encaminhar para TS de 2ª linha ^a .
Mutação inferida no gene <i>katG</i>	→ Resistência à isoniazida inferida; → A isoniazida não é eficaz, mesmo em doses altas.	Avaliar esquema para TB DR conforme perfil de resistência. Recomenda-se encaminhar para TS de 2ª linha ^a .
Mutação detectada no gene <i>rpoB</i>	→ Resistência à rifampicina detectada; → A rifampicina não é eficaz.	Avaliar esquema para TB DR conforme perfil de resistência. Recomenda-se encaminhar para TS de 2ª linha ^a .
Mutação inferida no gene <i>rpoB</i>	→ Resistência à rifampicina inferida; → A rifampicina não é eficaz.	Avaliar esquema para TB DR conforme perfil de resistência. Recomenda-se encaminhar para TS de 2ª linha ^a .

Fonte: adaptado de Global Laboratory Initiative, 2022¹.

Legenda: TB – tuberculose; TS – teste de sensibilidade; TB DR – tuberculose drogaresistente.

^a Encaminhar para o TS de 2ª linha, incluindo novas drogas.

Quadro 2 Resultados e interpretações dos laudos referentes ao teste de hibridização com sonda em linha (LPA) de 2ª linha

RESULTADO	INTERPRETAÇÃO	RECOMENDAÇÃO
Mutação NÃO detectada	→ Resistência não detectada; → O moxifloxacino, o levofloxacino e a amicacina são eficazes.	Avaliar a manutenção do esquema em uso, conforme os resultados dos testes realizados.
Mutação indeterminada	→ Resultado inconclusivo.	Recomenda-se realizar TS fenotípico de 2ª linha.
Mutação detectada no gene <i>gyrA</i> (1) ^a	→ Resistência ao levofloxacino detectada. O levofloxacino não é eficaz; → Resistência de baixo nível ao moxifloxacino detectada. O moxifloxacino pode ser eficaz em altas doses ^b .	Recomenda-se reavaliar o tratamento para TB DR e realizar TS fenotípico ^c .
Mutação detectada no gene <i>gyrA</i> (2) ^d	→ Resistência ao levofloxacino e ao moxifloxacino detectada. O levofloxacino e o moxifloxacino não são eficazes.	Recomenda-se reavaliar o tratamento para TB DR ^c .
Mutação inferida no gene <i>gyrA</i>	→ Resistência ao levofloxacino inferida. O levofloxacino não é eficaz; → Resistência de baixo nível ao moxifloxacino inferida. O moxifloxacino pode ser eficaz em altas doses ^b .	Recomenda-se reavaliar o tratamento para TB DR e realizar TS fenotípico.

continua

conclusão

RESULTADO	INTERPRETAÇÃO	RECOMENDAÇÃO
Mutação detectada no gene <i>gyrB</i>	→ Resistência ao levofloxacinó detectada. O levofloxacinó não é eficaz; → Resistência de baixo nível ao moxifloxacinó detectada. O moxifloxacinó pode ser eficaz em altas doses ^b .	Recomenda-se reavaliar o tratamento para TB DR e realizar TS fenotípico ^c .
Mutação inferida no gene <i>gyrB</i>	→ Resistência ao levofloxacinó inferida. O levofloxacinó provavelmente não é eficaz. → Resistência de baixo nível ao moxifloxacinó inferida. O moxifloxacinó pode ser eficaz em altas doses ^b .	Recomenda-se reavaliar o tratamento para TB DR e realizar TS fenotípico.
Mutação detectada no gene <i>rrs</i>	→ Resistência à amicacina detectada. A amicacina não é eficaz.	Recomenda-se reavaliar o tratamento para TB DR.
Mutação inferida no gene <i>rrs</i>	→ Resistência à amicacina inferida. A amicacina pode não ser eficaz.	Recomenda-se reavaliar o tratamento para TB DR e realizar TS fenotípico.
Mutação detectada no gene <i>eis</i>	→ Resistência à amicacina detectada. A amicacina não é eficaz.	Recomenda-se reavaliar o tratamento para TB DR.
Mutação inferida no gene <i>eis</i>	→ A amicacina é eficaz (a mutação inferida no gene <i>eis</i> não influencia na ação da amicacina).	Avaliar a manutenção do esquema em uso, conforme os resultados dos testes realizados.

Fonte: adaptado de Global Laboratory Initiative, 2022¹.

Legenda: TB – tuberculose; TS – teste de sensibilidade; TB DR – tuberculose drogarresistente.

^a *gyrA* (1) – quando houver mutação detectada em sondas que conferem resistência de baixo nível para moxifloxacinó (MUT1; MUT2 e MUT3A).

^b Altas doses de moxifloxacinó – 800mg por dia.

^c Encaminhar para o TS de 2ª linha, incluindo novas drogas.

^d *gyrA* (2) – quando houver mutação detectada em sondas que conferem resistência de alto nível para moxifloxacinó (MUT3B; MUT3C e MUT3D).

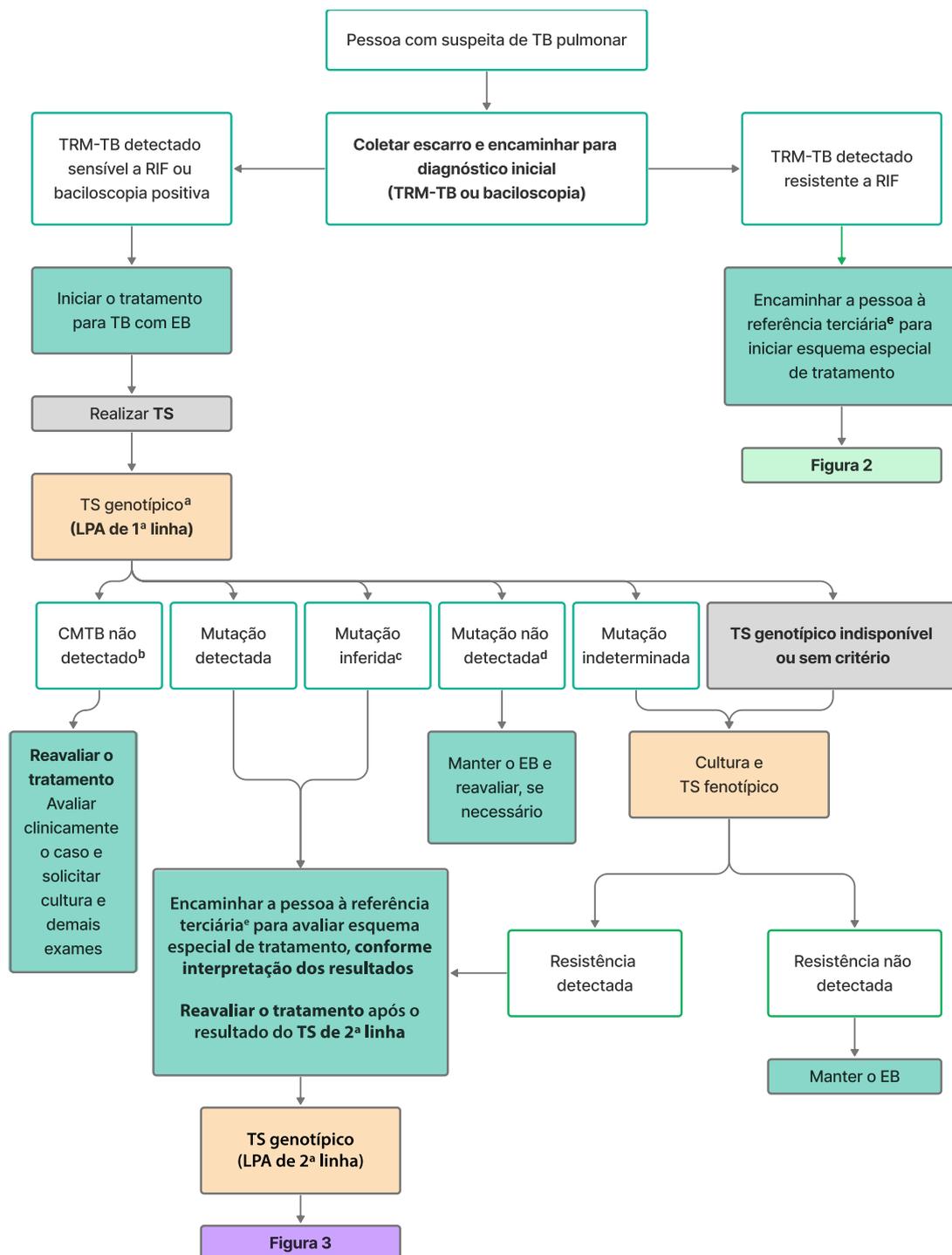
2.5 Considerações importantes

- » O TS genotípico cobre as principais mutações que conferem resistência aos fármacos de tratamento para o CMTB. Por se tratar de um teste que busca genes específicos do DNA das bactérias do complexo, a baciloscopia positiva e um resultado indeterminado ou inconclusivo para o LPA podem ser sugestivos de infecção por MNT. Nesses casos, recomenda-se a investigação para suspeita de MNT.
- » Quanto aos genes *katG* e *inhA*, quando a mutação for detectada e/ou inferida em ambos os genes ao mesmo tempo, há associação com resistência à isoniazida e à etionamida.
- » Se for identificada somente uma mutação inferida no gene *inhA*, sem mutação no gene *katG*, recomenda-se realizar o TS fenotípico para isoniazida e também o TS de 2ª linha, além de iniciar o esquema para TB DR, conforme perfil de resistência.
- » Na ausência de mutação nos genes *inhA* e *katG*, em caso de forte suspeita de TB DR, recomenda-se avaliar clinicamente o caso e considerar o TS fenotípico para isoniazida, para exclusão de mutações em outros genes não abarcados pelo teste,

como nos casos de pessoas em retratamento, pessoas com sinais e sintomas de TB e histórico de contato com alguém com TB resistente à isoniazida, pessoas com baciloscopia positiva no 2º mês de acompanhamento de tratamento, pessoas que apresentam falência ao tratamento com esquema básico ou pessoas com suspeita de resistência, em qualquer momento do tratamento.

- >> Mesmo na ausência de mutações no gene *inhA*, a resistência à etionamida não pode ser excluída, pois há o envolvimento de outros genes não avaliados pelo teste.
- >> Caso seja identificada mutação nos genes *gyrA* (MUT1; MUT2 e MUT3A) e/ou *gyrB*, responsáveis por conferir resistência de baixo nível ao moxifloxacino, recomenda-se realizar o TS fenotípico, a depender da interpretação laboratorial.
- >> Quando há mutação inferida no gene *rrs*, a amicacina provavelmente não é eficaz; recomenda-se avaliar por meio do TS fenotípico.
- >> Para fins de monitoramento dos insumos utilizados para diagnóstico dos agravos de interesse em saúde pública fornecidos pela Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública, preconiza-se a utilização da base de dados do Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL). O sistema GAL também possibilita a otimização e o acompanhamento das etapas de realização dos exames e a emissão de relatórios quantitativos, gerenciais e epidemiológicos, além de subsidiar a tomada de decisão do Ministério da Saúde no direcionamento de ações em saúde pública.
- >> Para a realização do LPA diretamente a partir de amostra de escarro, é necessário haver um fluxo de transporte de amostras e uma estrutura laboratorial adequada, com equipamentos específicos; assim, o teste estará disponível em serviços pré-definidos localmente. Para verificar a disponibilidade do LPA na sua rede assistencial, entre em contato com a coordenação de TB e o Lacen do estado. Mais informações podem ser obtidas por meio do Ofício Conjunto Circular n.º 4/2020/CGLAB/DAEVS/SVS/MS, que traz as definições do fluxo laboratorial para amostras suspeitas de tuberculose de acordo com a Rede de Referência Laboratorial para TB e micobactérias não tuberculosas (MNT).
- >> Informações adicionais e detalhadas sobre as questões laboratoriais de execução do teste poderão ser encontradas no Ofício Conjunto Circular n.º 17/2022/CGLAB/DAEVS/CGDR/DCCI/SVS/MS.

Figura 1 Fluxograma de uso do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) em amostras de pessoas com suspeita de tuberculose pulmonar com resultado no TRM-TB “MTB Detectado” e sem resistência à rifampicina ou com resultado positivo na baciloscopia



Fonte: CGTM/Dathi/SVSA/MS.

Legenda: CMTB – complexo *Mycobacterium tuberculosis*; EB – esquema básico de tratamento da tuberculose; LPA – teste de hibridização de sonda em linha; RIF – rifampicina; TB – tuberculose; TRM-TB – teste rápido molecular para tuberculose; TS – teste de sensibilidade.

^a O TS genotípico (LPA) pode ser realizado a partir de amostra de escarro, desde que se tenha um resultado prévio de TRM-TB ou baciloscopia, e a amostra precisa ser encaminhada ao laboratório executor em, no máximo, até quatro dias após a coleta.

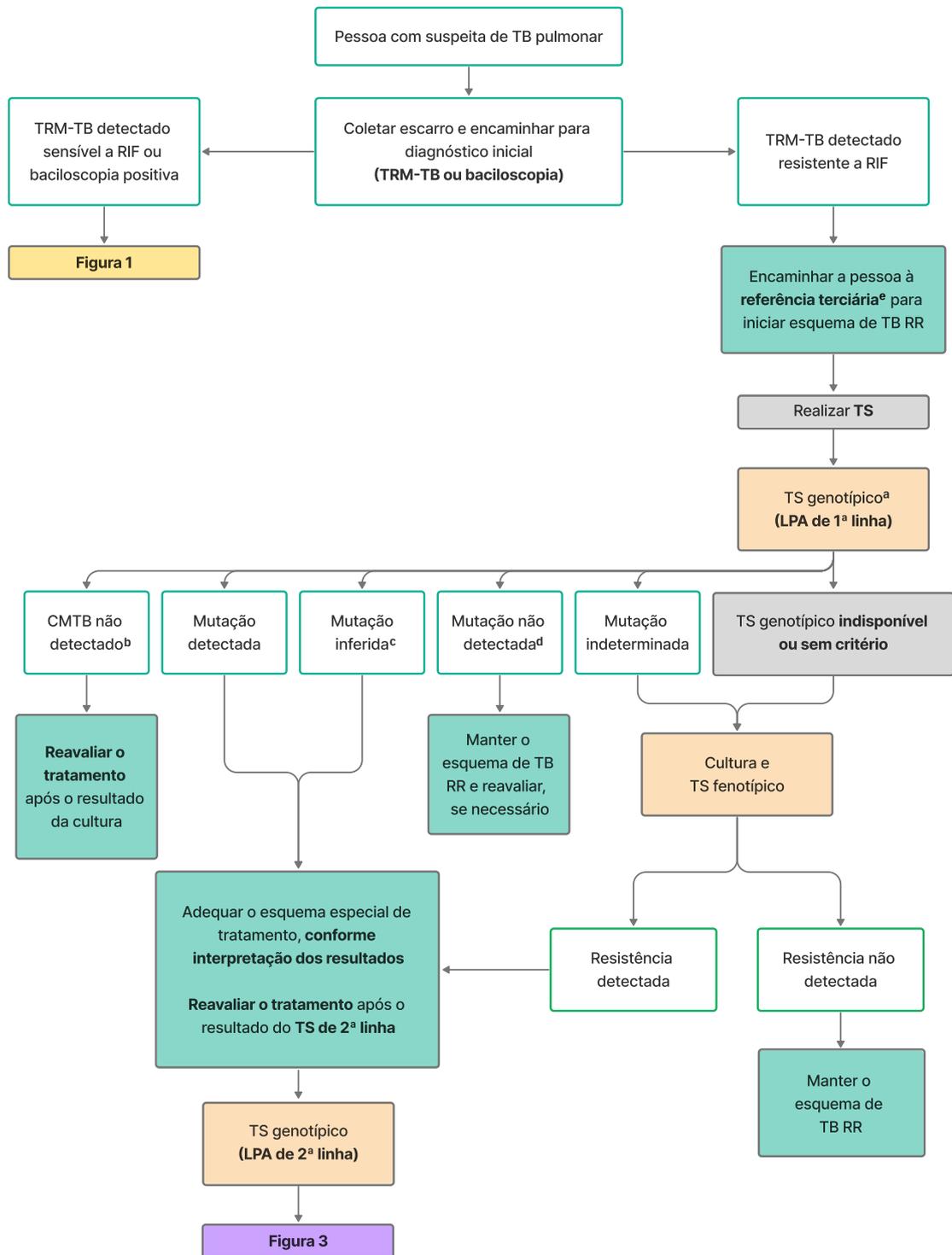
^b Quando realizado o TS genotípico diretamente a partir de amostra de escarro, o resultado poderá não ser bactéria do complexo MTB, devendo-se investigar micobactérias não tuberculosas.

^c Se for identificada somente uma mutação inferida no gene *inhA*, sem mutação no gene *katG*, recomenda-se realizar o TS fenotípico.

^d Recomenda-se confirmar moxifloxacino e amicacina no TS fenotípico e encaminhar para o TS fenotípico aos outros fármacos de 2ª linha.

^e Referência terciária é o ambulatório especializado em tratamento de TB drogaresistente. A pessoa deve chegar à referência terciária imediatamente após o diagnóstico de resistência. Nesse serviço, a avaliação médica e a conduta adequada deverão ser tomadas em até sete dias.

Figura 2 Fluxograma de uso do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) em amostras de pessoas com suspeita de tuberculose pulmonar com resultado no TRM-TB “MTB Detectado” e com resistência à rifampicina



Fonte: CGTM/Dathi/SVSA/MS.

Legenda: CMTB – complexo *Mycobacterium tuberculosis*; LPA – teste de hibridização de sonda em linha; RIF – rifampicina; TB – tuberculose; TB RR – tuberculose resistente à rifampicina pelo TRM-TB; TRM-TB – teste rápido molecular para tuberculose; TS – teste de sensibilidade.

^a O TS genotípico (LPA) pode ser realizado a partir de amostra de escarro, desde que se tenha um resultado prévio de TRM-TB ou baciloscopia, e a amostra precisa ser encaminhada ao laboratório executor em, no máximo, até quatro dias após a coleta.

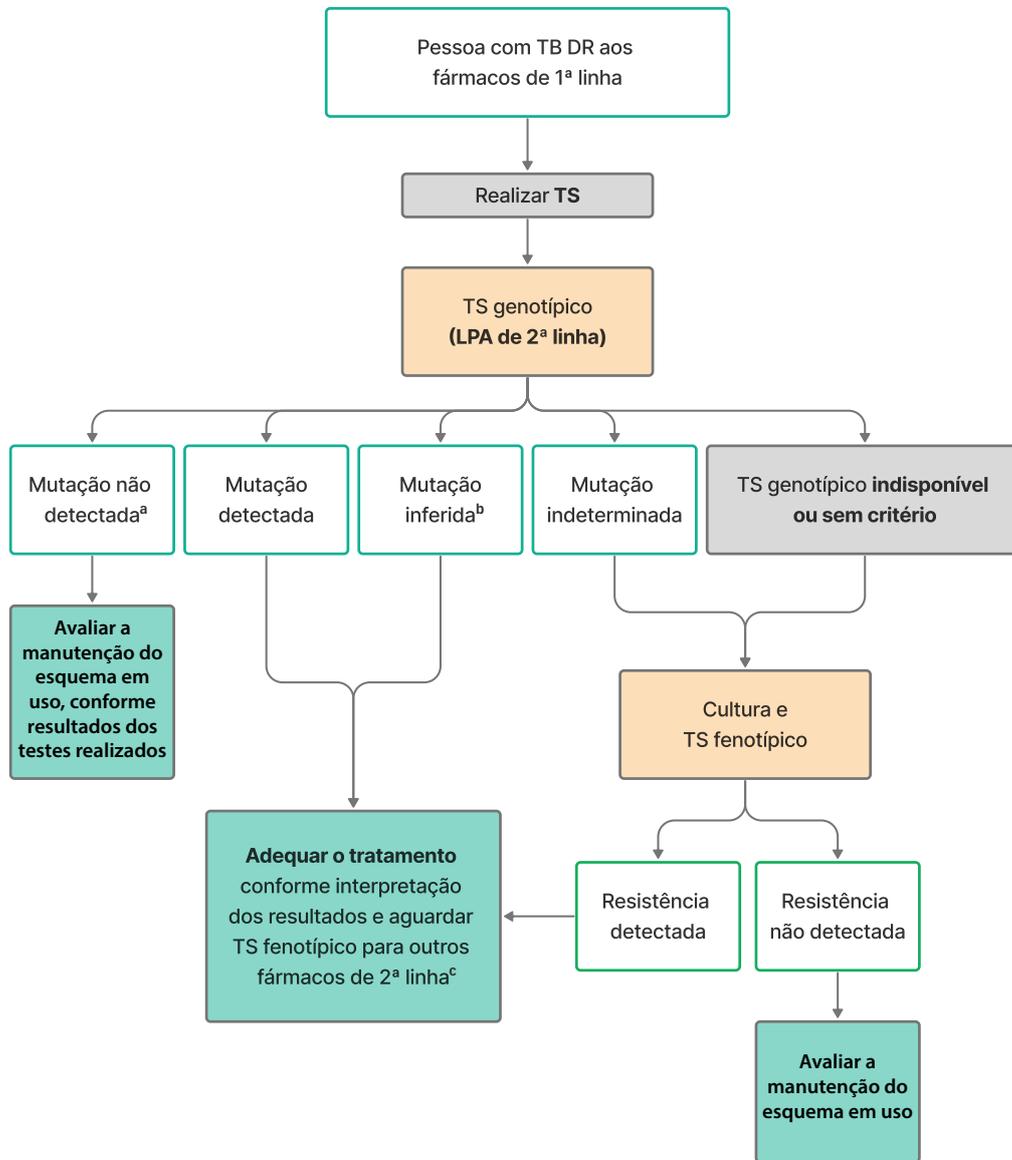
^b Quando realizado o TS genotípico diretamente a partir de amostra de escarro, o resultado poderá não ser bactéria do complexo MTB, devendo-se investigar MNT.

^c Se for identificada somente uma mutação inferida no gene *inhA*, sem mutação no gene *katG*, recomenda-se realizar o TS fenotípico.

^d Em caso de forte suspeita de TB drogarresistente, recomenda-se avaliar clinicamente o caso e considerar o TS fenotípico, para exclusão de resistências em outros genes não abarcados pelo teste.

^e Referência terciária é o ambulatório especializado em tratamento de TB drogarresistente. A pessoa deve chegar à referência terciária imediatamente após o diagnóstico de resistência. Nesse serviço, a avaliação médica e a conduta adequada deverão ser tomadas em até sete dias.

Figura 3 Fluxograma de uso do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) em amostras de pessoas com tuberculose drogarresistente aos fármacos de 1ª linha



Fonte: CGTM/Dathi/SVSA/MS.

Legenda: LPA – teste de hibridização de sonda em linha; TB – tuberculose; TB DR – tuberculose drogarresistente; TB RR – tuberculose resistente à rifampicina pelo teste rápido molecular para tuberculose; TS – teste de sensibilidade.

^a Caso seja identificada mutação nos genes *gyrA* e/ou *gyrB*, responsáveis por conferir resistência de baixo nível ao moxifloxacino, recomenda-se realizar o TS fenotípico, a depender da interpretação laboratorial.

^b A depender da mutação inferida, o laboratório poderá encaminhar para TS fenotípico para confirmação da resistência.

^c Outros fármacos de 2ª linha: clofazimina, linezolida, bedaquilina e delamanida.

3 PARTE II – LABORATÓRIO

3.1 Princípio do método

O LPA é um teste *in vitro* qualitativo para a identificação genética do complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e da resistência aos fármacos utilizados no tratamento da TB, a partir de amostra clínica de escarro ou de isolado de cultura.

O complexo *M. tuberculosis* inclui as seguintes bactérias: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis subsp. bovis*, *M. bovis subsp. caprae*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii* e *M. pinnipedii*.

O procedimento completo é dividido em três passos:

- 1) extração do DNA a partir de amostras de escarro ou de isolado de cultura;
- 2) amplificação dos segmentos de DNA por meio de PCR multiplex, com primers específicos biotinilados; e
- 3) hibridização reversa com as sondas do teste, que estão fixadas na tira de membrana.

As tiras de membrana são recobertas com sondas específicas, complementares a fragmentos do material genético amplificados. Após a desnaturação química, os produtos dos PCR ligam-se às sondas por hibridização nas regiões complementares a estas.

A estreptavidina conjugada com a fosfatase alcalina se liga à biotina dos amplicons e a fosfatase alcalina transforma o substrato adicionado em um corante que se torna visível a olho nu, nas tiras de membrana, como um precipitado colorido (bandas).

No LPA de 1ª linha, avaliam-se as mutações que conferem resistência à isoniazida, à etionamida e à rifampicina, por meio dos genes:

- >> *inhA* – etionamida e isoniazida
- >> *katG* – isoniazida
- >> *rpoB* – rifampicina

No LPA de 2ª linha, avaliam-se as mutações que conferem resistência a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos/peptídeos cíclicos, por meio dos genes:

- >> *gyrA* – fluoroquinolonas
- >> *gyrB* – fluoroquinolonas
- >> *rrs* – aminoglicosídeos/peptídeos cíclicos
- >> *eis* – aminoglicosídeos/peptídeos cíclicos

Nos esquemas de tratamento da TB, as fluoroquinolonas utilizadas são o moxifloxacino e o levofloxacino, e o aminoglicosídeo é a amicacina.

3.2 Biossegurança

Conforme o Ofício Circular n.º 12/2021/CGDR.DCCI/SVS/MS, a orientação inicial, para todos os laboratórios, independentemente do grau de complexidade dos exames executados, é realizar uma avaliação de risco que leve em consideração, principalmente⁷:

- 1) o tipo e o número de amostras clínicas processadas;

- 2) as técnicas executadas que possam, potencialmente, gerar aerossóis;
- 3) a estrutura física do laboratório;
- 4) as características epidemiológicas da doença; e
- 5) o nível de experiência e capacitação dos profissionais.

Os equipamentos de proteção individual (EPI) devem ser adequadamente utilizados, desde o recebimento das amostras até a execução de técnicas mais complexas. Alguns desses EPI são indispensáveis à rotina de diagnóstico laboratorial da TB, a saber:

- >> luvas de material resistente, de baixa permeabilidade e boa flexibilidade, descartáveis;
- >> respiradores do tipo N95 (NIOSH N95) ou PFF2 (EN149:2001), que apresentem porosidade de eficiência igual ou maior que 95%, para reter partículas de 0,3 µm; e
- >> aventais de mangas longas, com punhos sanfonados, de fechamento frontal com botões, preferencialmente de pressão, mantidos permanentemente fechados, e de comprimento abaixo dos joelhos, em tecido de algodão ou de fibra sintética não inflamável.

O processamento, a concentração de amostras biológicas e a execução da técnica de LPA a partir de amostra de escarro são técnicas consideradas de risco moderado para geração de aerossóis, com baixa concentração de partículas infecciosas.

Assim, recomenda-se que as unidades laboratoriais cumpram, minimamente, os seguintes requisitos para a realização das técnicas:

- 1) uso adequado de EPI;
- 2) manipulação das amostras em cabine de segurança biológica (CSB) classe II (com certificação e manutenção em dia);
- 3) instalação de exaustor com capacidade de seis a dez renovações do volume de ar por hora, para facilitar a retirada do ar contaminado e manter o fluxo de ar unidirecional; e
- 4) realização de todas as ações de biossegurança para laboratórios de TB de risco moderado de geração de aerossóis, conforme recomendações atualizadas do Ministério da Saúde e da OMS.

Já a manipulação de isolado de cultura previamente à inativação, visando a realização do LPA, é considerado procedimento de alto risco para geração de aerossóis, com alta concentração de partículas infecciosas. Assim, recomenda-se que as unidades laboratoriais cumpram, minimamente, os seguintes requisitos para a realização das técnicas:

- 1) uso adequado de EPI;
- 2) manipulação das culturas em CSB classe II (com certificação e manutenção em dia);
- 3) estruturação física do laboratório projetada para garantir as barreiras de contenção secundária (portas duplas de entrada, fluxo de ar unidirecional por meio de exaustão etc.); e
- 4) realização de todas as ações de biossegurança para laboratórios de TB de alto risco de geração de aerossóis, conforme recomendações atualizadas do Ministério da Saúde e da OMS.

3.3 Armazenamento e transporte

Todos os espécimes devem ser colhidos e transportados conforme indicado no Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil³.

O processamento inicial da amostra de escarro deve ocorrer em até quatro dias depois da coleta. Após a descontaminação e subsequente ressuspensão do pellet bacteriano no tampão fosfato, as amostras podem ser armazenadas a -20°C ou -80°C por um período máximo de cinco dias até a extração de DNA. Para a realização do LPA, utiliza-se 0,5 mL do material descontaminado.

3.4 Considerações importantes

O LPA é capaz de detectar as mutações mais frequentemente identificadas nas cepas resistentes aos fármacos utilizados no tratamento da TB. Entretanto, algumas mutações menos comuns, também passíveis de conferir resistência, podem estar fora das regiões cobertas pelo teste e, em alguns casos, a resistência não pode ser completamente excluída, principalmente quando se avaliam a isoniazida e as fluoroquinolonas, sendo necessária a realização de TS fenotípico para alguns casos.

Algumas mutações são identificadas especificamente por sondas na região MUT, enquanto outras são inferidas apenas pela ausência de ligação dos amplicons às sondas da cepa selvagem. A falta de ligação de uma sonda da cepa selvagem sem uma ligação simultânea de uma sonda MUT pode ocorrer devido à presença de uma mutação de resistência, mas também pode se dar pela presença de uma mutação silenciosa ou de sentido trocado.

Em amostras que apresentam cepas com perfil de heterorresistência, os testes genotípicos, tais quais os testes LPA, são menos eficientes na predição de resistência que os testes fenotípicos. As bactérias resistentes precisam representar 5% da população total da amostra avaliada para que seja detectada mutação pelas sondas MUT; porém, as mutações inferidas poderiam ser perdidas nesse contexto.

3.5 Interpretação laboratorial para emissão dos laudos

O LPA apresenta alguns controles internos cuja avaliação deve ser a primeira etapa da análise e da interpretação dos resultados.

A banda referente ao controle de conjugado (CC) deve estar sempre presente e sinaliza a eficiência da ligação do conjugado e da reação com o substrato.

O controle de amplificação (AC) é utilizado como referência para a interpretação das bandas WT e MUT, as quais só devem ser consideradas quando apresentarem intensidade tão ou mais forte que a banda AC.

Em caso de resultado positivo, a banda do controle AC pode aparecer fraca ou até mesmo não surgir. Isso pode acontecer devido à competição durante as reações de amplificação e ocorre com mais frequência quando o teste é realizado a partir de isolado de cultura. Para um resultado negativo válido, as bandas dos controles CC e AC devem estar sempre presentes; caso uma delas ou ambas estejam ausentes, o teste é considerado inválido.

Outro controle que deve ser avaliado é a banda de reação TUB, que somente estará presente se a amostra avaliada contiver DNA de membros do complexo *M. tuberculosis*.

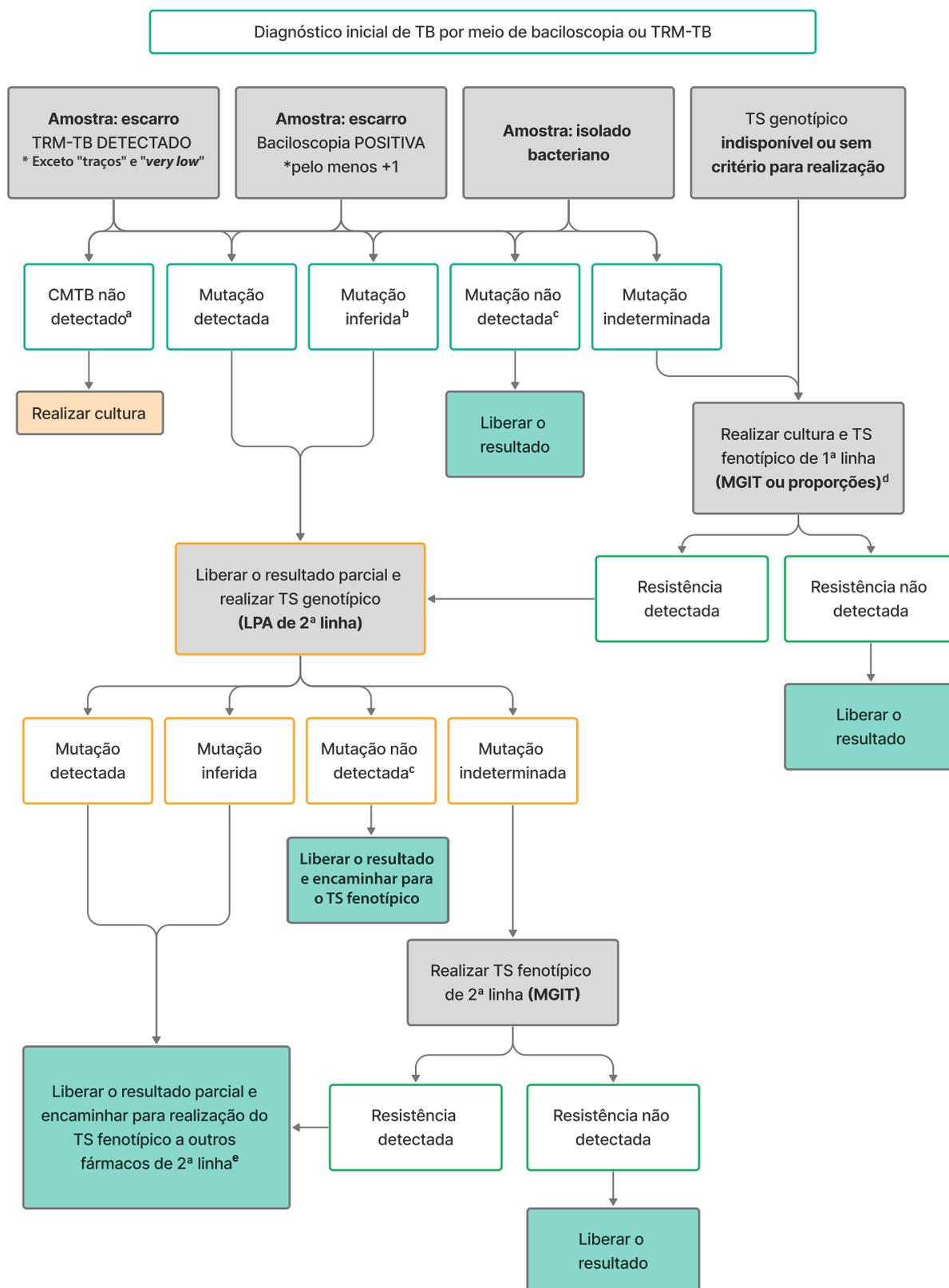
Quando, mesmo na presença das bandas CC e AC, não houver ligação com a sonda do complexo *M. tuberculosis*, a amostra precisa ser encaminhada para realização de cultura devido

à suspeição de micobactéria não tuberculosa (MNT). Antes de cada conjunto de bandas WT e MUT, encontra-se a banda relacionada ao controle da região-alvo avaliada, ou seja, a banda de controle do *locus*. Para que o resultado da região-alvo seja considerado válido, esse controle deve estar presente. Caso o controle de *locus* esteja ausente, o resultado é considerado indeterminado para o fármaco ou o conjunto de fármacos relacionados ao alvo analisado, e a amostra deve ser encaminhada para a realização de teste fenotípico.

Após a avaliação de todos os controles, os resultados poderão ser analisados com base na presença e ausência das bandas WT e MUT. A resistência é detectada quando as sondas MUT hibridizam-se com os fragmentos contidos na membrana (mutação detectada) ou quando há ausência de sondas WT (mutação inferida). O perfil de resultados está explicado no item 2.4. A detecção concomitante da sonda MUT e da sonda WT correspondente caracteriza um caso de heterorresistência (coexistência de bactérias sensíveis e resistentes na mesma amostra). Nesse caso, o resultado comunicado deve ser de resistência.

As interpretações dos testes e as condutas laboratoriais estão contidas nos Quadros 3 a 8 e foram adaptadas do material publicado pela Global Laboratory Initiative¹. A conduta clínica só é possível diante do conjunto de resultados encontrados e liberados no laudo laboratorial, não podendo ser avaliada isoladamente por gene.

Figura 4 Fluxograma laboratorial de uso do teste de hibridização de sonda em linha (LPA)



Fonte: CGTM/Dathi/SVSA/MS.

Legenda: CMTB – complexo *Mycobacterium tuberculosis*; LPA – teste de hibridização de sonda em linha; MGIT – tubo indicador de crescimento de bactérias; TB – tuberculose; TRM-TB – teste rápido molecular para tuberculose; TS – teste de sensibilidade.

^a Quando realizado o TS genotípico diretamente a partir de amostra de escarro, o resultado poderá não ser bactéria do complexo MTB, devendo-se investigar micobactérias não tuberculosas.

^b Se for identificada somente uma mutação inferida no gene *inhA*, sem mutação no gene *katG*, recomenda-se realizar o TS fenotípico.

^c Recomenda-se confirmar moxifloxacino e amicacina no TS fenotípico e encaminhar para o TS fenotípico aos outros fármacos de 2ª linha.

^d Priorizar a realização do MGIT pelo tempo reduzido para liberação do resultado.

^e Encaminhar ao LRN para realização do TS fenotípico aos outros fármacos de 2ª linha (linezolida, bedaquilina, delamanida e clofazimina).

Quadro 3 Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo do gene *rpoB* (rifampicina)

Região-alvo	Leitura da fita	Mutação ou região gênica	Laudo	Interpretação	Conduta laboratorial
<i>rpoB</i>	Ligação em todas as sondas WT E ausência de ligação nas sondas MUT	Sem mutação detectada	Mutação não detectada	Rifampicina eficaz.	Liberar laudo
<i>rpoB</i> WT1	Ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT1	Mutação(ões) nos códons 505 a 509	Mutação inferida no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina inferida; provavelmente a rifampicina não é eficaz.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
<i>rpoB</i> WT2	Ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT2	Mutação(ões) nos códons 510 a 513	Mutação inferida no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina inferida; provavelmente a rifampicina não é eficaz.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
<i>rpoB</i> WT2 e <i>rpoB</i> WT3	Ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT2 E ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT3	Mutação(ões) nos códons 510 a 517	Mutação inferida no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina inferida; provavelmente a rifampicina não é eficaz.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
<i>rpoB</i> WT3 e <i>rpoB</i> WT4	Ligação na sonda <i>rpoB</i> MUT1	D516V	Mutação detectada no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
	Ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT3 E ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT4 E ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> MUT1	Mutação(ões) nos códons 513 a 519	Mutação inferida no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina inferida; provavelmente a rifampicina não é eficaz.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
<i>rpoB</i> WT4 e <i>rpoB</i> WT5	Ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT4 E ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT5	Mutação(ões) nos códons 516 a 522	Mutação inferida no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina inferida; provavelmente a rifampicina não é eficaz.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
<i>rpoB</i> WT5 e <i>rpoB</i> WT6	Ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT5 E ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT6	Mutação(ões) nos códons 518 a 525	Mutação inferida no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina inferida; provavelmente a rifampicina não é eficaz.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
<i>rpoB</i> WT7	Ligação na sonda <i>rpoB</i> MUT2A	H526Y	Mutação detectada no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
	Ligação na sonda <i>rpoB</i> MUT2B	H526D	Mutação detectada no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
	Ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT7 E ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> MUT2A E ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> MUT2B	Mutação(ões) nos códons 526 a 529	Mutação inferida no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina inferida; provavelmente a rifampicina não é eficaz.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
<i>rpoB</i> WT8	Ligação na sonda <i>rpoB</i> MUT3	S531L	Mutação detectada no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
	Ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> WT8 E ausência de ligação na sonda <i>rpoB</i> MUT3	Mutação(ões) nos códons 530-533	Mutação inferida no gene <i>rpoB</i>	Resistência à rifampicina inferida; provavelmente a rifampicina não é eficaz.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas

Fonte: adaptado de Global Health Initiative, 2022¹.
 Legenda: LPA – teste de hibridização de sonda em linha.

Quadro 4 Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo dos genes *inhA* e *katG* (isoniazida e etionamida)

Região-alvo	Leitura da fita	Mutação ou região gênica	Laudo	Interpretação	Conduta laboratorial
<i>inhA</i>	Ligação em todas as sondas WT E ausência de ligação nas sondas MUT	Sem mutação detectada	Mutação não detectada	Isoniazida eficaz.	Avaliar clinicamente o caso e considerar o TS fenotípico ^a
<i>katG</i>	Ligação em todas as sondas WT E ausência de ligação nas sondas MUT	Sem mutação detectada	Mutação não detectada	Isoniazida eficaz.	Avaliar clinicamente o caso e considerar o TS fenotípico ^a
<i>katG</i> WT	Ligação na sonda <i>katG</i> MUT1 OU ligação na sonda <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2	Mutação detectada no gene <i>katG</i>	Resistência à isoniazida.	Encaminhar para LPA de 2ª linha
	Ausência de ligação na sonda <i>katG</i> WT E ausência de ligação na sonda <i>katG</i> MUT1 E ausência de ligação na sonda <i>katG</i> MUT2	Mutação(ões) na região do códon 315	Mutação inferida no gene <i>katG</i>	Resistência à isoniazida inferida; provavelmente a isoniazida não é eficaz, mesmo em doses altas.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
<i>inhA</i> WT1	Ligação na sonda <i>inhA</i> MUT1	c-15t	Mutação detectada no gene <i>inhA</i>	Resistência de baixo nível à isoniazida detectada; a isoniazida pode ser eficaz em altas doses. Resistência à etionamida detectada; a etionamida não é eficaz.	Encaminhar para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
	Ligação na sonda <i>inhA</i> MUT2	a-16g ^b	Mutação detectada no gene <i>inhA</i>	Resistência de baixo nível à isoniazida detectada; a isoniazida pode ser eficaz em altas doses. Resistência à etionamida detectada; a etionamida não é eficaz.	Encaminhar para TS fenotípico de 1ª linha, quando necessário ^c ; e para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
	Ausência de ligação na sonda <i>inhA</i> WT1 E ausência de ligação na sonda <i>inhA</i> MUT1 E ausência de ligação na sonda <i>inhA</i> MUT2	Mutação(ões) na região -15 ^b	Mutação inferida no gene <i>inhA</i>	Resistência de baixo nível à isoniazida inferida; a isoniazida pode ser eficaz em altas doses. Resistência à etionamida inferida; provavelmente a etionamida não é eficaz.	Mutação inferida somente no gene <i>inhA</i> deve seguir para TS fenotípico de 1ª linha
<i>inhA</i> WT2	Ligação na sonda <i>inhA</i> MUT3A	t-8c ^b	Mutação detectada no gene <i>inhA</i>	Resistência de baixo nível à isoniazida detectada; a isoniazida pode ser eficaz em altas doses. Resistência à etionamida detectada; a etionamida não é eficaz.	Encaminhar para TS fenotípico de 1ª linha, quando necessário ^c ; e para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
	Ligação na sonda <i>inhA</i> MUT3B	t-8a ^b	Mutação detectada no gene <i>inhA</i>	Resistência de baixo nível à isoniazida detectada; a isoniazida pode ser eficaz em altas doses. Resistência à etionamida detectada; a etionamida não é eficaz.	Encaminhar para TS fenotípico de 1ª linha, quando necessário ^c ; e para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas
	Ausência de ligação na sonda <i>inhA</i> WT2 E ausência de ligação na sonda <i>inhA</i> MUT3A E ausência de ligação na sonda <i>inhA</i> MUT3B	Mutação(ões) na região -8 ^b	Mutação na região gene <i>inhA</i>	Resistência de baixo nível à isoniazida inferida; a isoniazida pode ser eficaz em altas doses. Resistência à etionamida inferida; provavelmente a etionamida não é eficaz.	Encaminhar para TS fenotípico de 1ª linha, quando necessário ^c ; e para LPA de 2ª linha, incluindo TS para novas drogas

Fonte: adaptado de Global Laboratory Initiative, 2022¹.

Legenda: LPA – teste de hibridização de sonda em linha; TS – teste de sensibilidade.

^a Em caso de forte suspeita de TB drogarresistente, recomenda-se avaliar clinicamente o caso e considerar TS fenotípico. Algumas mutações que conferem resistência à isoniazida estão fora das regiões cobertas pelo teste e a resistência não pode ser completamente excluída, mesmo na presença de todas as sondas cepa selvagem.

^b Mutações que precisam de mais dados relacionados à correlação com TS fenotípico para aumentar a confiança de associação da mutação com a resistência à isoniazida.

^c Em caso de forte suspeita de TB drogarresistente, recomenda-se que a clínica considere o TS fenotípico, para exclusão de resistências em outros genes não abarcados pelo teste.

Quadro 5 Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo do gene *gyrA* (levofloxacino e moxifloxacino)

Região-alvo	Leitura da fita	Mutação ou região gênica	Laudo	Interpretação	Conduta laboratorial
<i>gyrA</i>	Ligação em todas as sondas WT E ausência de ligação nas sondas MUT	Sem mutação detectada	Mutação não detectada	Moxifloxacino e levofloxacino eficazes.	Encaminhar para TS fenotípico de 2ª linha ^a
<i>gyrA</i> WT1	Ausência de ligação na sonda <i>gyrA</i> WT1	Mutação(ões) nos códons 85 a 89	Mutação inferida no gene <i>gyrA</i>	Resistência ao levofloxacino inferida; o levofloxacino provavelmente não é eficaz. Resistência de baixo nível ao moxifloxacino inferida; o moxifloxacino pode ser eficaz em altas doses.	Realizar TS fenotípico para moxifloxacino no PCC ^b
<i>gyrA</i> WT2	Ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT1	A90V	Mutação detectada no gene <i>gyrA</i> (1)	Resistência ao levofloxacino. Resistência de baixo nível ao moxifloxacino detectada; o moxifloxacino pode ser eficaz em altas doses.	Realizar TS fenotípico para moxifloxacino no PCC ^b
	Ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT2	S91P	Mutação detectada no gene <i>gyrA</i> (1)	Resistência ao levofloxacino. Resistência de baixo nível ao moxifloxacino detectada; o moxifloxacino pode ser eficaz em altas doses.	Realizar TS fenotípico para moxifloxacino no PCC ^b
	Ausência de ligação na sonda <i>gyrA</i> WT2 E ausência de ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT1 E ausência de ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT2	Mutação(ões) nos códons 89 a 93	Mutação inferida no gene <i>gyrA</i>	Resistência ao levofloxacino inferida; o levofloxacino provavelmente não é eficaz. Resistência de baixo nível ao moxifloxacino inferida; o moxifloxacino pode ser eficaz em altas doses.	Realizar TS fenotípico para moxifloxacino no PCC ^b
<i>gyrA</i> WT3	Ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT3A	D94A	Mutação detectada no gene <i>gyrA</i> (1)	Resistência ao levofloxacino. Resistência de baixo nível ao moxifloxacino detectada; o moxifloxacino pode ser eficaz em altas doses.	Realizar TS fenotípico para moxifloxacino no PCC ^b
	Ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT3B	D94N ou D94Y	Mutação detectada no gene <i>gyrA</i> (2)	Resistência ao levofloxacino e ao moxifloxacino.	Liberar laudo e encaminhar para TS fenotípico para novas drogas
	Ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT3C	D94G	Mutação detectada no gene <i>gyrA</i> (2)	Resistência ao levofloxacino e ao moxifloxacino.	Liberar laudo e encaminhar para TS fenotípico para novas drogas
	Ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT3D	D94H	Mutação detectada no gene <i>gyrA</i> (2)	Resistência ao levofloxacino e ao moxifloxacino.	Liberar laudo e encaminhar para TS fenotípico para novas drogas
	Ausência de ligação na sonda <i>gyrA</i> WT3 E ausência de ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT3A E ausência de ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT3B E ausência de ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT3C E ausência de ligação na sonda <i>gyrA</i> MUT3D	Mutação(ões) nos códons 92 a 96	Mutação inferida no gene <i>gyrA</i>	Resistência ao levofloxacino inferida; o levofloxacino provavelmente não é eficaz. Resistência de baixo nível ao moxifloxacino inferida; o moxifloxacino pode ser eficaz em altas doses.	Realizar TS fenotípico para moxifloxacino no PCC ^b

Fonte: adaptado de Global Laboratory Initiative, 2022¹.

Legenda: PCC – ponto de corte clínico; TS – teste de sensibilidade.

^a Algumas mutações que conferem resistência ao moxifloxacino e ao levofloxacino estão fora das regiões cobertas pelo teste e a resistência não pode ser completamente excluída, mesmo na presença de todas as sondas da cepa selvagem. Avaliar caso a caso e encaminhar ao TS fenotípico para outros fármacos de 2ª linha.

^b Realizar TS fenotípico para moxifloxacino no ponto de corte clínico, ou seja, a concentração acima da concentração crítica, que separa as cepas que provavelmente responderão das que provavelmente não responderão ao tratamento. Esse ponto é usado para orientar as decisões clínicas no tratamento individual do paciente.

Quadro 6 Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo do gene *gyrB* (levofloxacino e moxifloxacino)

Região-alvo	Leitura da fita	Mutação ou região gênica	Laudo	Interpretação	Conduta laboratorial
<i>gyrB</i>	Ligação em todas as sondas WT E ausência de ligação nas sondas MUT	Sem mutação detectada	Mutação não detectada	Moxifloxacino e levofloxacino eficazes.	Encaminhar para TS fenotípico de 2ª linha ^a
<i>gyrB</i> WT	Ligação na sonda <i>gyrB</i> MUT1	N538D	Mutação detectada no gene <i>gyrB</i>	Resistência ao levofloxacino. Resistência de baixo nível ao moxifloxacino inferida; o moxifloxacino pode ser eficaz em altas doses.	Realizar TS fenotípico para moxifloxacino no PCC ^b
	Ligação na sonda <i>gyrB</i> MUT2	E540V	Mutação detectada no gene <i>gyrB</i>	Resistência ao levofloxacino. Resistência de baixo nível ao moxifloxacino inferida; o moxifloxacino pode ser eficaz em altas doses.	Realizar TS fenotípico para moxifloxacino no PCC ^b
	Ausência de ligação na sonda <i>gyrB</i> WT E ausência de ligação na sonda <i>gyrB</i> MUT1 E ausência de ligação na sonda <i>gyrB</i> MUT2	Mutação(ões) nos códons 536 a 541	Mutação inferida no gene <i>gyrB</i>	Resistência ao levofloxacino inferida; o levofloxacino provavelmente não é eficaz. Resistência de baixo nível ao moxifloxacino inferida; o moxifloxacino pode ser eficaz em altas doses.	Realizar TS fenotípico para moxifloxacino no PCC ^b

Fonte: adaptado de Global Laboratory Initiative, 2022¹.

Legenda: PCC – ponto de corte clínico; TS – teste de sensibilidade.

^a Algumas mutações que conferem resistência ao moxifloxacino e ao levofloxacino estão fora das regiões cobertas pelo teste e a resistência não pode ser completamente excluída, mesmo na presença de todas as sondas da cepa selvagem. Avaliar caso a caso e encaminhar ao TS fenotípico para outros fármacos de 2ª linha.

^b Realizar TS fenotípico para moxifloxacino no ponto de corte clínico, ou seja, a concentração acima da concentração crítica, que separa as cepas que provavelmente responderão das que provavelmente não responderão ao tratamento. Esse ponto é usado para orientar as decisões clínicas no tratamento individual do paciente.

Quadro 7 Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo do gene *rrs* (amicacina)

Região-alvo	Leitura da fita	Mutação ou região gênica	Laudo	Interpretação	Conduta laboratorial
<i>rrs</i>	Ligação em todas as sondas WT E ausência de ligação nas sondas MUT	Sem mutação detectada	Mutação não detectada	Amicacina possivelmente eficaz.	Encaminhar para TS fenotípico de 2ª linha ^a
<i>rrs</i> WT1	Ligação na sonda <i>rrs</i> MUT1	a1401g	Mutação detectada no gene <i>rrs</i>	Resistência à amicacina.	Liberar laudo final
	Ausência de ligação na sonda <i>rrs</i> WT1 E ausência de ligação na sonda <i>rrs</i> MUT1 E	Mutação(ões) na região 1400	Mutação inferida no gene <i>rrs</i>	Resistência à amicacina inferida; a amicacina pode não ser eficaz.	Encaminhar para TS fenotípico de 2ª linha
<i>rrs</i> WT2	Ligação na sonda <i>rrs</i> MUT2	g1484t	Mutação detectada no gene <i>rrs</i>	Resistência à amicacina.	Liberar laudo e encaminhar para TS fenotípico para novas drogas
	Ausência de ligação na sonda <i>rrs</i> WT2 E ausência de ligação na sonda <i>rrs</i> MUT2 E	Mutação(ões) na região 1484	Mutação inferida no gene <i>rrs</i>	Resistência à amicacina inferida; a amicacina pode não ser eficaz.	Encaminhar para TS fenotípico de 2ª linha

Fonte: adaptado de Global Laboratory Initiative, 2022¹.

Legenda: TS – teste de sensibilidade.

^a Algumas mutações que conferem resistência à amicacina estão fora das regiões cobertas pelo teste e a resistência não pode ser completamente excluída, mesmo na presença de todas as sondas da cepa selvagem.

Quadro 8 Interpretação da leitura do teste de hibridização de sonda em linha (LPA) considerando a região-alvo do gene *eis* (amicacina)

Região-alvo	Leitura da fita	Mutação ou região gênica	Laudo	Interpretação	Conduta laboratorial
<i>eis</i>	Ligação em todas as sondas WT E ausência de ligação nas sondas MUT	Sem mutação detectada	Mutação não detectada	Amicacina possivelmente eficaz.	Encaminhar para TS fenotípico de 2ª linha ^a
<i>eis</i> WT1	Ausência de ligação na sonda <i>eis</i> WT1	Mutação(ões) na região -37	Mutação inferida no gene <i>eis</i>	Não influencia na interpretação da resistência à amicacina.	Encaminhar para TS fenotípico de 2ª linha
	Ligação na sonda <i>eis</i> MUT1	c-14t	Mutação detectada no gene <i>eis</i>	Resistência à amicacina.	Liberar laudo
<i>eis</i> WT2	Ausência de ligação na sonda <i>eis</i> WT2 E ausência de ligação na sonda <i>eis</i> MUT1 E	Mutação(ões) na região -10 a -14	Mutação inferida no gene <i>eis</i>	Resistência à amicacina inferida; a amicacina pode não ser eficaz.	Encaminhar para TS fenotípico de 2ª linha
<i>eis</i> WT3	Ausência de ligação na sonda <i>eis</i> WT3	Mutação(ões) na região -2	Mutação inferida no gene <i>eis</i>	Resistência à amicacina inferida; a amicacina pode não ser eficaz.	Encaminhar para TS fenotípico de 2ª linha

Fonte: adaptado de Global Laboratory Initiative, 2022¹.

Legenda: TS – teste de sensibilidade.

^a Algumas mutações que conferem resistência à amicacina estão fora das regiões cobertas pelo teste e a resistência não pode ser completamente excluída, mesmo na presença de todas as sondas da cepa selvagem.

REFERÊNCIAS

1. GLOBAL LABORATORY INITIATIVE. **Line probe assays for detection of drug-resistant tuberculosis**: interpretation and reporting manual for laboratory staff and clinicians. Geneva: WHO, 2022.
2. HAIN LIFESCIENCE GmbH. **Instruções de uso GenoType MTBDRplus**. 2017. Disponível em: https://www.biometrix.com.br/wp-content/uploads/2017/07/TBDRplusV2_0615_304A-06-06.pdf. Acesso em: 12 maio 2023.
3. 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, DF: MS, 2022.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin**. Geneva: WHO, 2008.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs**: policy guidance. Geneva: WHO, 2016.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologias e Insumos Estratégicos. Portaria n.º 43. Incorporar os testes comerciais de sondas em linha para detecção do complexo Mycobacterium tuberculosis (MTB) e de mutações nas regiões determinantes de resistência à rifampicina e isoniazida (1ª linha) e a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (2ª linha), no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 127, p. 144, 8 jul. 2021.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Coordenação-Geral de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória de Condições Crônicas. **Ofício Circular n.º 12/2021/CGDR/DCCI/SVS/MS**. Recomendações de biossegurança laboratorial no contexto do diagnóstico laboratorial de tuberculose (TB). Brasília, DF: MS; 2021. Disponível em: https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/copy_of_portarias/2021/oficio-circular-no-12-2021-cgdr-dcci-svs-ms. Acesso em: 12 maio 2023.

Conte-nos o que pensa sobre esta publicação. [Clique aqui](#) e responda à pesquisa.

DISQUE
SAÚDE **136**

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde
bvsm.s.saude.gov.br



MINISTÉRIO DA
SAÚDE

Governo
Federal