

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES ASSOCIADAS COM A RESISTÊNCIA À
PIRAZINAMIDA E ETAMBUTOL EM ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis***

VÍVIAN DE F. SUMNIENSKI RODRIGUES

Porto Alegre, fevereiro de 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES ASSOCIADAS COM A RESISTÊNCIA À
PIRAZINAMIDA E ETAMBUTOL EM ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis***

VÍVIAN DE F. SUMNIENSKI RODRIGUES

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Arnaldo Zaha

Porto Alegre, fevereiro de 2005

RESUMO

Caracterização de Mutações Associadas com a Resistência à Pirazinamida e Etambutol em Isolados de *Mycobacterium tuberculosis*

Vívian de F. Sumnienski Rodrigues

Os estudos sobre a resistência de *Mycobacterium tuberculosis* aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose (TB), vêm sendo cada vez mais explorados com o objetivo de entender melhor como funcionam os mecanismos utilizados pela micobactéria. A partir do aumento da transmissão ativa de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes às drogas, tanto no Rio Grande do Sul quanto em outras regiões do Brasil, fez-se necessário um estudo relativo à resistência de *M. tuberculosis* à pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB). Sabe-se até o momento que existem genes específicos que, possivelmente sejam alvos de alterações e podem proporcionar resistência ao *M. tuberculosis*, no entanto ainda não se têm relatos do tipo e da frequência destas mutações nos isolados do nosso Estado e de outros locais do Brasil. Sendo assim, neste trabalho buscou-se estudar isolados de *M. tuberculosis*, fenotipicamente caracterizados como resistentes à PZA e/ou EMB e determinar seu perfil de susceptibilidade a partir de caracterização das mutações nos genes *pncA* e *embB*, envolvidos respectivamente com a resistência à PZA e EMB. A metodologia utilizada foi baseada primeiramente na caracterização dos isolados pelos métodos tradicionais (testes fenotípicos de susceptibilidade) seguida de extração de DNA, amplificação dos genes alvo e posteriormente seqüenciamento dos mesmos. A partir da análise das seqüências obtidas foi possível caracterizar 12 novas mutações no gene *pncA*, distribuídas ao longo de todo o gene, que possivelmente estejam envolvidas com a resistência dos respectivos isolados à PZA. A análise dos isolados resistentes à EMB demonstrou que nossos isolados apresentam alterações somente no códon 306 do gene *embB* de *M. tuberculosis*. Após este estudo, será possível avaliar a ocorrência das mutações nos genes específicos e inferir sobre a possível interferência das mesmas nos mecanismos relacionados com a resistência a essas drogas. Conhecendo melhor os isolados de nosso país, poderemos fornecer informações para o desenvolvimento de um melhor método de detecção da

resistência. Este método, depois de adequadamente testado poderá colaborar de forma decisiva nos programas de controle da tuberculose.

ABSTRACT

Characterization of Mutations Associated with Pyrazinamide and Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates

Vívian de F. Sumnienski Rodrigues

Extensive research about *Mycobacterium tuberculosis* resistance to drugs used in tuberculosis (TB) treatment has been performed in order to have a better understanding of the mechanisms used by mycobacteria. Once active transmission of drug resistant strains of *M. tuberculosis* has been occurring both in Rio Grande do Sul State and in other regions of Brazil, it brought up the need of performing a study related to *M. tuberculosis* pyrazinamide (PZA) and ethambutol (EMB) resistance. It is known that specific genes are targets of alterations, which can lead to *M. tuberculosis* resistance, however, up to this moment there are no records about types or frequencies of those mutations in isolates from Rio Grande do Sul State and other sites in Brazil. Thus, in this study we aimed to evaluate *M. tuberculosis* isolates phenotypically characterized as PZA and/or EMB resistant, in order to determine their susceptibility profile based on the characterization of mutations in *pncA* and *embB* genes, involved in PZA and EMB resistance, respectively. Methodology used in the study was primarily based on the characterization of isolates by conventional methods (phenotypic susceptibility tests) followed by DNA extraction, target genes amplification and DNA sequencing. Sequence analysis revealed 12 novel mutations in *pncA* gene distributed all along the gene and they are possibly involved with PZA resistance in those isolates. Analysis of EMB resistant isolates showed our isolates presented alterations at codon 306 of *embB* gene of *M. tuberculosis* only. From this study it will be possible to evaluate the presence of mutations in specific genes in order to establish a correlation between their occurrence and the effects in the mechanisms related to the emergence of resistance to those drugs. Improving our knowledge about the isolates in our country we will be able to provide information that can be useful for the development of a methodology for the early detection of resistance. This methodology, if properly tested and validated can be highly helpful for the improvement of TB control programs.

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Arnaldo Zaha pela oportunidade e pela confiança que depositou em mim desde o início da minha formação acadêmica. Muito obrigada por todos os ensinamentos e pelo grande exemplo de dignidade, inteligência e caráter.

À Dr^a Maria Lucia Rossetti pela amizade e orientação e por acompanhar minha formação acadêmica sempre incentivando a realização dos trabalhos e vibrando com minhas conquistas.

Ao LACEN e a FEPPS, em especial ao CDCT e ao Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose pela excelente infra-estrutura na qual foi realizado este trabalho.

Ao Instituto Adolfo Lutz, em especial à Maria Alice Telles do Laboratório de Tuberculose, pela realização de parte deste trabalho.

A todas as colegas e amigas (mulherada!!!!) do CDCT-FEPPS. Sintam-se todas agradecidas pela ótima convivência.

Às minhas queridas amigas Marta e Simone pela incansável colaboração que deram a este trabalho e também pelas divertidíssimas e produtivas conversas, regadas a vinho ou cerveja, a partir das quais foram geradas excelentes idéias, que certamente tiveram influência na realização e finalização desta tese.

À minha grande amiga Terimar Ruosso Moresco (Terry) pela ajuda que me deu na realização de algumas centenas de seqüenciamentos, pelas divertidas conversas e pela persistência na continuação deste trabalho.

Às amigas Tatiana Gregianini, Magda Gal, Raquel Mashmann e Lia Possuelo, por terem em alguns momentos me auxiliado na realização de experimentos.

À amiga Patrícia Cafrune pela impagável ajuda em muitas partes deste trabalho, pela parceria nos momentos de descontração e principalmente pela amizade que permanece entre nós.

Ao Dr. Pedro Almeida da Silva, pelo grande incentivo que deu e pelo interesse que demonstrou na realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Irene Shrank por ter acompanhado o desenvolvimento deste trabalho como membro da comissão de acompanhamento do PPGBCM.

Aos secretários do PPGBCM pelo grande auxílio que me deram em várias ocasiões sempre com muita dedicação e bom humor.

Aos meus queridos pais Gilberto e Marilene e ao meu amado irmão Eduardo pelo incessante incentivo e companheirismo que sempre me deram. Amo vocês!!!!

Ao meu marido Rogério, companheiro desde os primórdios desta caminhada. A ele todo o meu amor!!!

À CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos que, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	14
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1- TUBERCULOSE	16
2.1.1- <i>Epidemiologia</i>	16
2.1.2. <i>Etiologia – M. tuberculosis</i>	19
2.1.3. <i>Transmissão</i>	21
2.2. TRATAMENTO	22
2.2.1. <i>Fármacos Anti-TB</i>	22
2.2.2. <i>Esquemas Terapêuticos</i>	23
2.3- RESISTÊNCIA	26
2.3.1. <i>Fatores Associados com o Desenvolvimento da Resistência</i>	26
2.3.2- <i>Freqüência de Mutações Espontâneas em M. tuberculosis</i>	28
2.3.3- <i>Mecanismos Moleculares da Resistência à Pirazinamida</i>	31
2.3.4- <i>Mecanismos Moleculares de Resistência a Etambutol</i>	34
2.4 - TESTES DISPONÍVEIS PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA	37

2.4.1- Metodologias fenotípicas	38
2.4.2- Metodologias genotípicas	41
3- JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	43
4-OBJETIVOS	45
4.1-Objetivos específicos	45
5- MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.1- Local de desenvolvimento do estudo	46
5.2- Seleção da amostra	46
5.3- Critérios de Inclusão	47
5.4- Número amostral	47
5.5- Amostras clínicas e cultura de M. tuberculosis	48
5.6- Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	48
5.7- Determinação da concentração inibitória mínima (CMI)	49
5.8- Teste de atividade da pirazinamidase	49
5.9- Extração de DNA	50
5.10- Amplificação dos genes de interesse	51
5.10.1- Primers utilizados	51
5.10.2- Condições da PCR	54
5.11- Análise dos fragmentos amplificados	55
5.12- Purificação dos fragmentos amplificados	55
5.13- Seqüenciamento automático	55
5.13.1- Precipitação dos produtos para seqüenciamento	56
5.13.2- Análise das seqüências	56
5.14- Genotipagem dos isolados	56
5.14.1- Spoligotyping	56
5.14.1.1- Primers	57
5.14.1.2- Reação de Amplificação	57
5.14.1.3- Hibridização dos Produtos da PCR e Detecção	57
5.14.2- DRE-PCR	58
5.14.2.1- Primers	58

5.14.2.2- Reação de Amplificação	59
5.14.2.3- Detecção dos Fragmentos Amplificados pela PCR	59
6- RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
6.1- Perfil de susceptibilidade dos isolados de M. tuberculosis pelos testes convencionais	60
6.2- Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para EMB	60
6.3- Padronização das condições de amplificação por PCR para caracterização de isolados de M. tuberculosis resistentes à PZA	61
6.3.1- Temperatura de anelamento dos primers	61
6.3.2- Concentração de MgCl ₂	62
6.3.3- Determinação da concentração de DNA e de primer	62
6.4- Padronização das condições de amplificação por PCR para caracterização de Isolados de M. tuberculosis resistentes à EMB	64
6.5- Análise das seqüências	67
6.5.1- Isolados resistentes à PZA	67
6.5.2- Isolados resistentes à EMB	74
6.5.2.1- Análise das seqüências	75
6.5.2.2- Comparação entre os testes realizados	77
7- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	84
8- BIBLIOGRAFIA	86
9- ANEXOS	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Esquemas de tratamento da TB utilizados no Brasil desde 1979.	23
Tabela 2- Características dos fármacos anti-TB usados nos esquemas terapêuticos de primeira linha: atividade, mecanismos de ação e de resistência.	27
Tabela 3- Concentração crítica das drogas empregadas no teste de susceptibilidade de MTB e proporção crítica de mutantes resistentes.	36
Tabela 4- Perfil de susceptibilidade dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> determinado pelos testes	44

convencionais

Tabela 5- Distribuição dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> , em relação aos valores de CMI para EMB	57
Tabela 6- Teste de concentrações de <i>Enhancer Solution</i>	62
Tabela 7- Alterações encontradas no gene <i>pncA</i> de isolados de <i>M. tuberculosis</i> no Brasil resistentes à PZA.	69
Tabela 8- Percentuais das alterações encontradas nos isolados de <i>M. tuberculosis</i> resistentes à PZA.	70
Tabela 9- Alterações encontradas nos isolados de <i>M. tuberculosis</i> resistentes à Etambutol.	74
Tabela 10- Perfil dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> que apresentaram discordância entre os métodos estudados (Testes Convencionais, CMI e Seqüenciamento), para BEM.	77
Tabela 11- Distribuição dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> analisados por seqüenciamento e sua relação com os valores de CMI.	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Coeficiente de incidência de TB no Brasil, 2001.	17
Figura 2- Estrutura da Pirazinamida	28
Figura 3- Desenho esquemático do mecanismo de ação da PZA em <i>M. tuberculosis</i> .	30
Figura 4- Estrutura do Etambutol	31
Figura 5- Desenho esquemático do mecanismo de ação do EMB em <i>M. tuberculosis</i>	33
Figura 6- Posicionamento dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>pncA</i> e do fragmento do gene <i>embB</i> .	49
Figura 7- Padronização das condições de reação de PCR: teste com diferentes temperaturas de anelamento dos <i>primers</i> .	60
Figura 8- Produtos de PCR gerados a partir de DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	60
Figura 9- Teste de concentrações de <i>Enhancer Solution</i> . Produtos de PCR gerados a partir de DNA de <i>M. tuberculosis</i> .	63
Figura 10- Produtos de PCR gerados a partir de DNA de <i>M. tuberculosis</i> extraído de isolados de amostras clínicas de pacientes da rede de saúde pública do RS.	64
Figura 11- Representação esquemática das alterações encontradas no gene <i>pncA</i> de <i>M. tuberculosis</i> encontradas neste trabalho.	70
Figura12- Representação esquemática das alterações encontradas no fragmento do gene <i>embB</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> encontradas neste trabalho.	73
Figura 13- Esquema da distribuição dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> de acordo com os resultados de seqüenciamento, perfil de susceptibilidade pelos métodos convencionais e CMI.	76
Figura 14- Comparação entre eletroferogramas obtidos após seqüenciamento de <i>M</i>	80

.tuberculosis (H37Rv) e uma cepa resistente à EMB, mostrando a troca da Met 306 por Ile.

LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS E UNIDADES

Abreviatura	Significado
AAC	<i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BCG	Bacilo de Calmette Guérin
BK	Bacilo de Koch
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
°C	Graus Celcius
CDCT	Centro de desenvolvimento Científico e Tecnológico
CFZ	clofazimina
CMI	concentração mínima inibitória
CMP	ciprofloxacina
CTAB	Brometo Cetiltrimetilamônia
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Desoxinucleosídeos trifosfatos
DOTS	<i>Direct Observed Therapy Strategy</i>
DPA	β -D-arabinofuronosil-1-monofosforil decaprenol
DRE-PCR	<i>Double-Repetitive-Element</i> PCR
EDTA	Ácido Etileno diaminotetracético
EMB	etambutol
EMB-R	resistente à EMB
EtBr	Brometo de etídeo
ETH	etionamida
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
H ₂ O	água
INH	Isoniazida
IS	Seqüência de inserção
kb	Quilobase
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LJ	Löwenstein-Jensen
KCl	Cloreto de potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
M	Molar
min	minuto
μ g	micrograma
μ L	microlitro
mL	Mililitro

mM	Milimolar
MODS	<i>Microscopic Observation Broth Drug Susceptibility Assay</i>
MTT	Brometo de tetrazolium
NaCl	Cloreto de sódio
ng	nanogramas
nt	nucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Sequência aberta de leitura</i>
PAS	Ácido p-aminosalicílico
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCT	Programa de Controle da Tuberculose
PGRS	Seqüência Polimórfica Ricas em G e C
pmol	picomol
POA	Acido pirazínóico
PZA	Pirazinamida
PZA-R	Resistente à pirazinamida
PZAse	pirazinamidase
RMP	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SDS	Sodium duodecil sulfate
seg	segundo
SINAN	Sistema de Informações de Agravos e Notificações
SM	Estreptomicina
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
<i>Taq</i>	<i>Termus aquaticus</i>
TB	tuberculose
TBMR	Tuberculose multirresistente
TE	Tris+EDTA
TSA	Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos
U	Unidade (atividade enzimática)
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Ultravioleta
VT	Virgem de tratamento
X	Veze
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. APRESENTAÇÃO

Os estudos sobre a resistência de *Mycobacterium tuberculosis* aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose (TB), vêm sendo cada vez mais explorados com o objetivo de entender melhor como funcionam os mecanismos utilizados pela micobactéria. A resistência pode estar relacionada à não adesão do paciente ao tratamento e também à administração incorreta dos fármacos, o que tem trazido repercussões negativas ao programa de controle da tuberculose (PCT). Uma estratégia de acompanhamento da terapia, o DOTS (*Direct Observation Therapy Strategy*) é indicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma ferramenta fundamental contra a emergência e a disseminação da TB resistente.

Para a determinação da resistência, a metodologia clássica recomendada (padrão ouro) é o método das proporções, realizado em meio sólido ou em sistemas automatizados ou semi-automatizados. Para países em desenvolvimento, essas metodologias, apresentam um custo elevado ou são de difícil execução na rotina do laboratório. No entanto, novas metodologias mais rápidas e de baixo custo, estão sendo desenvolvidas com a intenção de atender às necessidades de realizar os testes de maneira prática e efetiva. O método que mede a concentração mínima inibitória (CMI), pode ser considerado uma alternativa simples para laboratórios de rotina que possuam infra-estrutura básica para cultivo de *M. tuberculosis*. Porém, sabe-se que, além de necessitar da cultura (30 dias) muitas vezes este método possui deficiências na sua realização, principalmente quando se trata de pirazinamida.

Portanto, neste trabalho buscou-se estudar isolados de *M. tuberculosis*, determinando o perfil de susceptibilidade para PZA e EMB e, caracterizando as mutações nos genes *pncA*, envolvidos com a resistência à PZA, e *embB*, envolvidos com a resistência à EMB.

Isso possibilitou a busca de uma associação entre a presença ou não de mutações nos genes estudados e os testes convencionais.

A seção de revisão bibliográfica inicia descrevendo a situação da TB, sua epidemiologia, transmissão e tratamento, as pesquisas mais recentes relacionadas com a resistência aos fármacos, principalmente PZA e EMB, mecanismos de resistência e de ação desses fármacos, assim como uma visão atualizada dos principais métodos de determinação da susceptibilidade do *M. tuberculosis* aos fármacos usados no tratamento da TB. Na seção de materiais e métodos foram detalhadas as condições de como o trabalho foi desenvolvido. Os resultados obtidos através dos experimentos realizados nesse trabalho foram descritos e discutidos, tendo como base de interpretação a literatura atual disponível.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Tuberculose

A tuberculose, é uma doença de distribuição universal que, nos meados do século XX, constituía-se em uma das principais causas de morte no mundo (Raviglione *et al.*, 1995). Com as melhorias das condições de vida nos países desenvolvidos e a instituição do tratamento quimioterápico, houve uma redução de sua morbidade e, principalmente da mortalidade. Até a década de 80 tinha-se a expectativa da eliminação dessa enfermidade, já considerada sob controle nos países desenvolvidos. Contudo, o crescimento mundial de sua incidência levou, em 1993, a OMS a declarar esta doença em estado de emergência, alertando para a necessidade de maiores esforços no seu combate (WHO, 1994). Apesar dos procedimentos dos programas de controle da tuberculose (TB) e dos regimes terapêuticos usados, existem problemas inerentes à doença que incluem o surgimento de cepas resistentes aos fármacos usados no tratamento, à alta correlação da incidência da doença em populações pobres e, ainda, a imunodepressão causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), criando as condições ideais para a transformação da TB em uma doença oportunista (Kaufmann and Van Embden, 1993, Brasil, 2002).

2.1.1- Epidemiologia

Atualmente, existem 2 bilhões de pessoas infectadas pelo *M. tuberculosis* (1/3 da população) no mundo. A taxa de mortalidade é de 2,5 a 3 milhões de pessoas por ano (WHO, 2002). Durante a década de 90, aproximadamente 30 milhões de pessoas morreram em

conseqüência da doença (Kritski *et al.*, 2000). Estima-se que ocorram 8,7 milhões de novos casos a cada ano e que cerca de 350 mil mortes refiram-se a pacientes com TB associado à Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) (WHO, 2002).

Na América Latina, o Brasil ocupa o 15° lugar entre os 22 países que são responsáveis por 80% dos casos estimados da doença e junto com o Peru, respondem por 50% dos casos de TB nas Américas (Brasil, 2004). Anualmente notificam-se cerca de 100 mil casos de TB, sendo que 85 mil são casos novos, morrendo cerca de 6 mil pacientes (3,07 óbitos/100.000 habitantes). Segundo dados do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), em 2001, foram notificados 81.432 casos novos (correspondente a um coeficiente de incidência de 47,2/100.000 habitantes) (Figura 1). Em relação ao encerramento do tratamento, 72,2% receberam alta por cura, 11,7% representam abandono de tratamento, 7% de óbitos e 9,1% de transferências (Brasil, 2004).

A estimativa é que entre os anos de 2000 e 2020, aproximadamente 1 bilhão de pessoas estarão infectadas, 150 milhões de pessoas ficarão doentes e 36 milhões morrerão por TB (WHO, 2004). Estes dados alertam para a gravidade da situação atual e perfazem uma ameaça significativa ao controle desta doença.

Secretaria de Vigilância Sanitária
Coeficiente de Incidência da Tuberculose – Brasil, 2001.

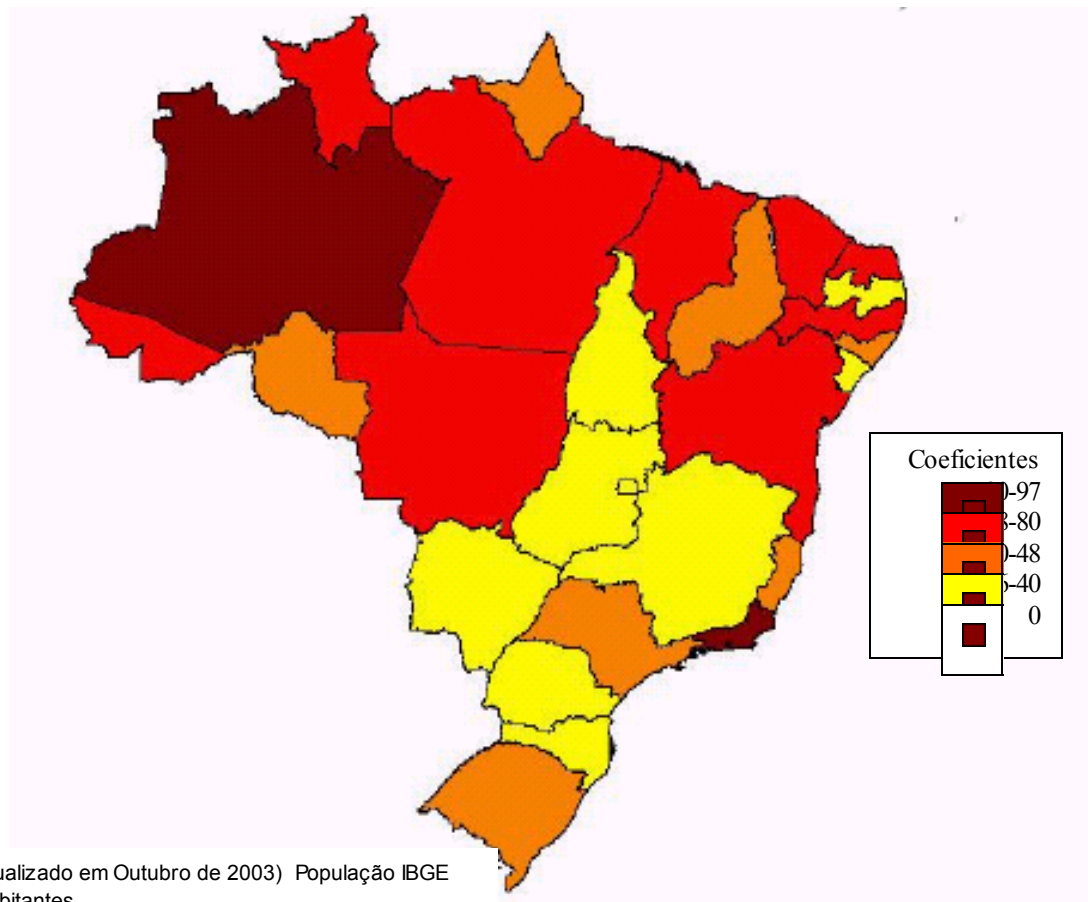


Figura 1. Coeficiente de incidência de TB no Brasil. Fonte: Ministério da Saúde, SVS, Brasil, 2004.

2.1.2. Etiologia – *M. tuberculosis*

As micobactérias pertencem à ordem dos *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. As bactérias que compõe este gênero, apesar de serem diferentes em relação à morfologia das colônias e às propriedades bioquímicas, possuem características taxonômicas comuns, como a presença de ácidos graxos de cadeia longa C₆₀-C₉₀ (ácidos micólicos), ácido desoxirribonucléico (DNA) com 61% a 71% de teor de guanina e citosina (G+C), e álcool-ácido resistência quando expostas a coloração tintorial pelo método de Ziehl-Neelsen (Goodfellow and Magee, 1998).

M. tuberculosis é também chamada de bacilo de Koch (BK), por ter sido isolado e descrito em 1882, por Robert Koch, ao obter seu cultivo e reproduzir a enfermidade em animais de laboratório. A espécie *M. tuberculosis* é o protótipo do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, do qual também fazem parte *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*. Recentemente outras duas subespécies foram incluídas dentro do complexo: *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti*, isolado na África e Europa (Van Soolingen *et al*, 1997) e *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae*, isolada principalmente de caprinos (Aranaz *et al*, 1999).

Várias características e comportamentos da espécie *M. tuberculosis* explicam muitas das questões da história natural da doença. O bacilo é classificado como aeróbico estrito, parasita intracelular facultativo, causador de patogenia intracelular, não formador de esporos nem de cápsulas, sem flagelos (imóvel), não produtor de toxinas. O envelope celular é complexo e serve de proteção à ação de agentes químicos, mas é susceptível à ação de agentes físicos,

como calor, luz solar e radiação ultravioleta. Fora do organismo hospedeiro, o bacilo só consegue sobreviver no meio externo por algumas horas. Duplica-se em 18 a 48 horas, dependendo da oferta de oxigênio, do pH do meio e dos nutrientes (Brennan and Nakaido, 1995; Metchock *et al*, 1999).

Outra característica do *M. tuberculosis* é apresentar dormência metabólica, permanecendo no interior do macrófago com metabolismo muito reduzido e sobrevivendo por anos no organismo humano. O estado de dormência ou latência no qual os bacilos permanecem dentro dos tecidos infectados reflete uma redução no metabolismo resultante da ação da resposta imune celular, que pode reprimir, mas não erradicar a infecção. Tal propriedade tem um importante significado clínico, já que a TB freqüentemente representa a reativação de uma infecção antiga, subclínica, ocorrida há vários anos (Chan and Kaufmann, 1994).

O genoma completo da cepa H37Rv de *M. tuberculosis* foi seqüenciado. O DNA deste organismo é composto de 4.411.529 pb, contém em torno de 4.000 genes, e um conteúdo de G+C de 65,5%, o qual é refletido na composição dos aminoácidos das proteínas. Este genoma é rico em DNA repetitivo, como as seqüências de inserção (IS). O conteúdo de G+C é constante em todo o genoma, indicando provável ausência de transferência horizontal de genes envolvidos com a patogenicidade. Várias regiões são bastante ricas em G+C, correspondendo a seqüências pertencentes a grandes famílias gênicas, que incluem seqüências polimórficas ricas em G+C (PGRSs). Uma característica importante do *M. tuberculosis* é a grande capacidade codificante do DNA micobacteriano ser direcionada à produção de enzimas envolvidas na lipólise, e, duas novas famílias de proteínas ricas em glicina com uma estrutura repetitiva que pode representar uma fonte de variação antigênica (Cole *et al*, 1998).

2.1.3. Transmissão

A principal forma de transmissão do bacilo da TB é de pessoa a pessoa e por via respiratória. Os pacientes considerados bacilíferos constituem fonte de disseminação da doença, pois eliminam gotículas de até 10 µm de diâmetro, contendo de 2 a 10 bacilos, através da tosse e do espirro. Um paciente pulmonar bacilífero, se não tratado, em um ano pode infectar de 10 a 15 pessoas. As gotículas são estáveis e, quando eliminadas, ficam em suspensão no ar por várias horas, podendo chegar aos alvéolos pulmonares onde se multiplicam. As gotículas maiores com quantidades maiores de bacilos não constituem fonte de infecção, porque logo se depositam no solo, não formando aerossóis e se forem inalados não conseguem chegar aos alvéolos, sendo carregados para a orofaringe, sendo deglutidos e expectorados. Os bacilos depositados em mucosas intactas ou na pele não conseguem invadir o tecido (Bates, 1980; Stead and Dutt, 1989).

Alguns fatores determinam a probabilidade de transmissão da doença, dentre eles podemos citar: (i) as características das fontes de infecção, pacientes bacilíferos e as pessoas que coabitam com ele, levando-se em consideração que a concentração de bacilos eliminada por uma pessoa é estimada em 10^2 a 10^4 de lesões nodulares, mas pode chegar a 10^7 a 10^8 de lesões cavitárias (Canetti, 1965); (ii) a concentração de bacilos no ar, determinada pelo volume do ambiente e sua ventilação; (iii) o tempo de exposição; e (iv) a condição imune da pessoa exposta (Smith and Moss, 1994). A descoberta precoce dos doentes bacilíferos entre os sintomáticos respiratórios e outros grupos de risco e a introdução de um tratamento antimicrobiano eficaz, além de curar o

doente, reduzem a capacidade de transmissão e assim proporcionam a quebra da cadeia epidemiológica da doença (Trujillo and Kritski, 2000)

2.2. Tratamento

A interrupção da cadeia de transmissão (pacientes bacilíferos), pela quimioterapia, é uma das principais formas de controlar a TB. A administração do tratamento deve (i) combinar pelo menos 3 fármacos, com ação sobre diferentes sítios de lesão e sobre diferentes fases do metabolismo bacteriano, para prevenir o desenvolvimento de resistência; (ii) ser realizada por tempo prolongado, levando em consideração os bacilos de crescimento lento (em torno de 20 horas) sua atividade metabólica e a localização celular e, (iii) ser tomada regularmente para manter as concentrações necessárias sobre a população bacilar (Brasil, 1995; IUATLD, 2000).

A população micobacteriana patogênica pode ser dividida em quatro componentes: (i) com metabolismo ativo e crescimento rápido, em ambiente aeróbio; (ii) com metabolismo semidormente em ambiente intracelular ácido (lisossomo), onde há uma baixa concentração de oxigênio; (iii) com metabolismo semidormente em ambiente intracelular não ácido (citoplasma); e (iv) com metabolismo extracelular dormente. Esta última apresenta uma propriedade única da infecção micobacteriana, onde o microrganismo é capaz de sobreviver quiescente por anos ou décadas (Mitchison, 1985; Gillespie, 2002).

2.2.1. Fármacos Anti-TB

A partir da década de 30, vários fármacos foram testados para a TB, sem sucesso. Na década de 40, o uso da estreptomicina (SM) proporcionou uma evolução favorável do tratamento da TB. Algum tempo depois o ácido p-aminosalicílico (PAS), necessário para evitar a seleção de micobactéria resistente, passou a ser utilizado. Em 1952 a isoniazida (INH) foi disponibilizada, e sendo um agente mais eficiente que a SM e PAS, tornou a TB curável, na maioria dos pacientes. Em 1965, a rifampicina (RMP) foi reconhecida como um potente fármaco anti-TB (Iseman, 1994; Blanchard, 1996).

A ação dos fármacos contra micobactérias pode ser dividida em duas categorias: (i) fármacos de amplo espectro que tem atividade contra micobactérias e muitas outras espécies bacterianas: cicloserina, fluoroquinolonas, macrolídeos, rifamicinas, estreptomicinas; (ii) fármacos que têm espectro específico, com atividade restrita a micobactérias, ou mesmo a apenas espécies micobacterianas: etionamida (ETH), INH, PAS, ciprofloxacina (CPM), etambutol (EMB), pirazinamida (PZA), tiacetazona (TZ), e clofazimina (CFZ). A atividade específica antimicobacteriana pode também resultar da conversão do fármaco inativo por mecanismos específicos das micobactérias (Chopra and Brennan, 1998).

2.2.2. Esquemas Terapêuticos

Inúmeros tipos de terapia já foram utilizados ao longo dos anos no Brasil. Na década de 60, o tratamento era de 18 meses de duração e utilizava SM, INH, e PAS. Esse tratamento era geralmente indicado para os pacientes que respondiam ao tratamento. Para os pacientes crônicos foram definidos esquemas de 2ª linha e de reserva, compostos pelo EMB, ETH, PZA,

CPM e outros fármacos. Ainda na década de 60, mais precisamente em 1965, o Brasil reduziu o tratamento para 3 meses de SM, INH e PAS, 6 meses de INH e PAS e 6 meses de INH. Para o retratamento, 4 meses de EMB, PZA e ETH e 8 meses de ETH ou PZA. Em 1971, o esquema terapêutico padronizado de 1ª linha foi modificado, passando a ser 3 meses de SM, INH e TZ e 9 meses de INH e T (Brasil, 2002).

Em 1979, o Brasil introduziu o esquema de curta duração, utilizando RMP, INH e PZA, 2 meses e RMP e INH, por 4 meses. Esse esquema de curta duração, apesar de mais eficaz e menos tóxico, era 20 vezes mais caro do que o anterior. Entretanto, seu uso, associado a uma política racional de redução de hospitalizações, trouxe economia significativa de recursos, possibilitando sua implementação em todo o país, de forma pioneira em todo o mundo (Ruffino-Netto, 1999; Brasil, 2002). Somente em 1993, a OMS e a *American Thoracic Society* (ATS), fizeram a recomendação para uso mundial do esquema de curta duração (Iseman, 1993; WHO, 1994).

O EMB, assim como a INH, RMP, SM é um fármaco com propriedade bactericida extremamente importante nas terapias contra TB, pois atua inibindo o crescimento do microrganismo. A esterilização da população bacilar semidormente em ambiente intracelular ácido, cujo pH é 5,5 (no interior dos lisossomos dos macrófagos) é conseguida pela ação de PZA. A RMP é mais ativa contra organismos semidormentes em meio não ácido. Assim o tratamento da TB deve ser feito sempre com associação de fármacos, evitando o desenvolvimento de cepas resistentes, considerando que, numa população bacilar que infecta o paciente, há sempre uma proporção desta população que é naturalmente resistente aos fármacos, por mutações espontâneas (Mitchison, 1985; Blanchard, 1996; Zhang and Telenti, 2000; Gillespie, 2002).

De acordo com o Plano Nacional de Controle da Tuberculose/Manual de Normas (5ª edição, 2000), e mostrado na Tabela 1, hoje em dia no Brasil, o tratamento é padronizado e a definição do esquema mais adequado é elaborado a partir da forma clínica, da idade e da história de tratamento anterior e seu resultado.

Tabela 1. Esquemas de tratamento da TB utilizados no Brasil desde 1979

Esquemas de Tratamento da TB		
Sem tratamento anterior, casos novos de		2 meses: RMP / INH / PZA
todas as formas exceto meningoencefalite	Esquema 1	4 meses: RMP / INH
Com tratamento anterior, casos de		2 meses: RMP / INH / PZA
retratamento em recidivas ou retorno após	Esquema 1	4 meses: RMP / INH / EMB
abandono do esquema 1	<i>Reforçado</i>	
Meningoencefalite tuberculosa		2 meses: RMP / INH / PZA
Casos de meningite tuberculosa	Esquema 2	7 meses: RMP / INH
Falência do esquema 1 ou esquema 1		3 meses: SM / ETH / PZA
reforçado e casos de falência do 1, 1R ou 2	Esquema 3	9 meses: ETH / EMB

A medicação é administrada diariamente e deve ser em uma única dose. O tratamento é desenvolvido nos serviços de saúde pública e a hospitalização será apenas em determinadas situações, como meningoencefalite tuberculosa, indicações cirúrgicas e outras complicações graves da doença (Brasil, 1995; Brasil, 1997). Considera-se “sem tratamento anterior” ou “virgem de tratamento” (VT), os pacientes que nunca se submeteram à quimioterapia antituberculose ou a fez por apenas 30 dias; “retratamento” é a prescrição de um esquema de fármacos para o doente já tratado por mais de 30 dias e a menos de 5 anos, que venha a necessitar de nova terapia por recidiva após cura, retorno após abandono ou por falência dos esquemas 1 e esquema 1 reforçado (1R); “falência” é a persistência da positividade do escarro ao final do tratamento ou os casos em que no início do tratamento são fortemente positivos (++ ou +++) e mantém essa situação até o 4º mês de tratamento, ou aqueles que são positivos no início, tornam-se negativos e voltam a positivar a partir do 4º mês de tratamento. Nos casos de falência do esquema 3, os doentes são encaminhados para unidades de referência para o devido acompanhamento de regimes especiais, com esquemas de tratamento adequados de fármacos alternativos (Brasil, 2002).

2.3- Resistência

2.3.1. Fatores Associados com o Desenvolvimento da Resistência

Os fatores que afetam negativamente o Programa de Controle da Tuberculose (PCT) incluem a falta de um esquema terapêutico padronizado, a deficiência na sua implementação e

manutenção, escassez no fornecimento dos fármacos em áreas com inadequados recursos ou instabilidade política. O uso de fármacos anti-TB de baixa qualidade é uma preocupação adicional. O desenvolvimento de resistência pode envolver também uma escolha inapropriada do esquema terapêutico, algumas vezes devido ao desconhecimento de um tratamento anterior, pode levar a erros como prescrição de um único fármaco. Outro fator importante é a não adesão do paciente ao tratamento prescrito. A frequência da resistência aos fármacos anti-TB é um indicador da qualidade do PCT, pois evidencia a ausência de um sistema organizado para assegurar um rápido diagnóstico, um tratamento eficiente e uma supervisão dos casos de TB (WHO, 1997; Espinal, 2001).

De modo geral, os microrganismos vêm desenvolvendo inúmeros mecanismos de resistência que impossibilitam a ação dos medicamentos. O entendimento destes mecanismos torna-se fundamental para que este problema seja solucionado (Kenneth *et al.*, 2003).

O rápido desenvolvimento de resistência pelos microrganismos é uma resposta evolucionária à pressão seletiva dos antibióticos. Muitas bactérias possuem sistemas de resistência bem caracterizados, alterações no alvo da droga ou em ativadores enzimáticos, mudanças na permeabilidade celular e geração de mecanismos de efluxo da droga são os mecanismos mais comuns utilizados para adquirir resistência (Kenneth *et al.*, 2003).

A membrana celular das micobactérias é considerada uma excelente barreira, visto que é uma estrutura rica em ácidos micólicos os quais colaboram significativamente na baixa permeabilidade da membrana.

Diferentes estratégias tem sido usadas pelo *M. tuberculosis* para desenvolver resistência aos antibióticos: (i) mecanismos de “barreira”, redução de permeabilidade e bombas

de efluxo, (ii) degradação ou inativação de enzimas e, (iii) modificação do “alvo” do fármaco (mutações gênicas).

A resistência pode ser classificada como *adquirida*, quando os bacilos adquirem resistência durante o tratamento ou primária, quando o paciente se infecta com bacilos resistentes. A resistência à INH tem sido associada à mutações nos genes *inhA* e *katG* em 75% dos casos (Blanchard, 1996; Musser *et al.*, 1996) e as mutações localizadas no gene *rpoB* têm sido responsáveis pela resistência à RIF em 94-98% dos isolados (Telenti *et al.*, 1993; Cooksey *et al.*, 1997; Valim *et al.*, 2000). Quanto à resistência à EMB, esta está associada em 50-70% com mutações no gene *embB* (Sreevatsan *et al.*, 1997b, Telenti *et al.*, 1997; Ramaswamy *et al.*, 2000), enquanto mutações no gene *pncA*, que codifica para a enzima pirazinamidase, têm sido notadas e reportadas em 72-100% dos casos de resistência à PZA (Scorpio and Zhang, 1996; Scorpio *et al.*, 1997; Sreevatsan *et al.*, 1997a). A resistência à SM vem sendo determinada, predominantemente, por mutações no gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossômica S12. Cerca de 70% dos isolados resistentes à SM possuem alterações neste gene (Finken *et al.*, 1993). Pouco se sabe sobre as bases moleculares da resistência às drogas de segunda linha no tratamento da tuberculose (amicacina, capreomicina, canamicina, ácido para-amino-salicílico, etionamida, tiacetazona, cicloserina, viomicina e fluoroquinolonas (Campos, 1999). Um resumo dos fármacos e seus respectivos alvos de ação pode ser visualizado na Tabela 2.

M. tuberculosis resistente às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose cada vez mais vem sendo reconhecido como um problema de saúde pública no mundo (Espinal *et al.*, 2001). Conseqüentemente, a rápida identificação de cepas resistentes tornou-se um assunto crítico para muitos laboratórios. Ensaios de PCR juntamente com o seqüenciamento de DNA

vêm sendo desenvolvidos para detectar mutações em diversas regiões do genoma de *M. tuberculosis* que estão associadas com o desenvolvimento de resistência (Murray *et al.*, 2003).

2.3.2- Freqüência de Mutações Espontâneas em *M. tuberculosis*

Taxa de mutação é o termo aplicado para estimar o número de mutações por unidade de tempo (por geração) e considera se a mutação foi favorável, desfavorável ou neutra. Freqüência de mutação mede os mutantes numa dada população sem considerar o tempo em que esta ocorreu durante a multiplicação celular. Assim, a freqüência de mutantes é um corte transversal na população bacteriana num determinado tempo e reflete não somente a taxa de mutação mas também as condições da população bacteriana antes da mutação ocorrer (Martinez & Baquero, 2000).

As mutações ocorrem espontaneamente e ao acaso, sendo portanto importante conhecer a proporção de mutantes que se espera obter numa população de bacilos e a taxa de mutação para os fármacos usados no tratamento da tuberculose, para uma melhor interpretação dos testes laboratoriais de susceptibilidade.

Durante a infecção, nas cavidades pulmonares, a população micobacteriana é de 10^7 a 10^9 bacilos (Canetti, 1965). As mutações genéticas do *M. tuberculosis* que levam a resistência à RMP ocorrem numa taxa de 10^{-10} mutações por divisão celular e levam a uma prevalência estimada de 1 em cada 10^8 bacilos, em ambiente sem o fármaco. Portanto, a “resistência genética” (mutações espontâneas) ocorre mesmo na ausência da exposição antimicrobiana, é diluída pela maioria das micobactérias sensíveis. A presença de antimicrobianos fornece uma pressão seletiva para os organismos resistentes tornarem-se predominantes, especialmente em

pacientes com uma grande carga de bacilos, isto é, com uma extensa lesão cavitária (WHO, 1997a).

Tabela 2. Características dos fármacos anti-TB usados nos esquemas terapêuticos de primeira linha: atividade, mecanismos de ação e de resistência.

Fármaco/ Atividade	Mecanismo de ação	Alvo molecular	*Taxa de mutação	Frequência de mutação **	Genes envolvidos	Função
isoniazida (1952) bactericida bacilos ativos	inibição da síntese de ácidos micólicos	síntese do ácido micólico	10 ⁻⁸	1 em 10 ⁶	<i>katG</i> <i>inhA</i> <i>ahpC</i> <i>kasA</i>	Conversão pró-fármaco alvo do fármaco marcador resistência alvo do fármaco
rifampicina (1965) bactericida bacilos ativos, em latência e com crescimento intermitente	inibição da transcrição	subunidade β da RNA polimerase	10 ⁻¹⁰	1 em 10 ⁸	<i>rpoB</i>	alvo do fármaco
pirazinamida (1970) bactericida bacilos em latência e no interior de macrófagos	acidificação do citoplasma inibição da síntese de ácidos graxos	? ?	10 ⁻³	1 em 10 ⁸	<i>pncA</i> <i>fasI</i>	Conversão pró-fármaco alvo do fármaco
etambutol (1968) bacteriostático, bacilos ativos	inibição da síntese do arabinogalac tano	Polissacari- do da parede celular	10 ⁻⁷	1 em 10 ⁵	<i>embA</i>	alvo do fármaco
estreptomomicina (1944) bacilos ativos	inibição da síntese protéica	proteínas ribossomais	10 ⁻⁸	1 em 10 ⁷	<i>rpsL</i> <i>rrs</i>	alvo do fármaco alvo do fármaco

Adaptação das Tabelas apresentadas por Zhang & Telenti, 2000 e Coll, 2003. * taxa de mutação – mutação espontânea (bacilos por divisão celular) ** freqüência de mutação – resistência natural (ambiente sem o fármaco)

2.3.3- Mecanismos Moleculares da Resistência à Pirazinamida

A pirazinamida (PZA) (Figura 2) é um análogo estrutural da nicotinamida que foi descoberto como agente anti-tuberculose em 1945 por Chorine. É um importante componente no tratamento da TB, já que possui atividade contra os bacilos semidormentes, localizados no interior dos macrófagos (Heifets *et al.*, 1992; Morlock *et al.*, 2000; Zhang and Mitchison, 2003). O uso deste fármaco permitiu a redução do período de tratamento de 12 para 6 meses (Yeger *et al.*, 1952; Snider *et al.*, 1982; Mitchison, 1985; Morlock *et al.*, 2000; Zhang and Mitchison, 2003).

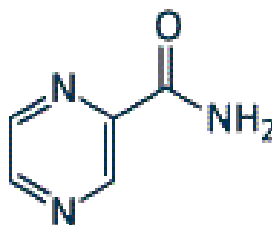


Figura 2- Estrutura da Pirazinamida

Os fundamentos bioquímicos da ação deste fármaco ainda não são inteiramente conhecidos, entretanto sabe-se que ocorre uma conversão da droga em ácido pirazinóico (POA) por intermédio de uma enzima, a pirazinamidase (PZAase) e desta forma ocorre a ação micobactericida (Figura 3) (Konno *et al.*, 1967; Speirs *et al.*, 1995; Zhang and Mitchison, 2003). Recentemente, Zhang e colaboradores descreveram a atividade da PZA e do ácido pirazinóico sobre o potencial de membrana de *M. tuberculosis*. Os autores demonstram a inibição da síntese de proteínas, bem como o rompimento do transporte e do potencial de membrana em pH ácido (Zhang *et al.*, 2003).

Isolados resistentes à PZA são comumente definidos pelo teste de atividade da PZAase (Konno *et al.*, 1967). Inúmeros estudos têm demonstrado a correlação entre resistência à PZA e baixos níveis desta enzima (Waine, 1974; McClatchy *et al.*, 1981; Butler and Kilburn, 1983; Miller *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2000; Zhang and Mitchison, 2003).

A ação da PZA é altamente específica para o *M. tuberculosis*, tendo pouco ou nenhum efeito com outras micobactérias, incluindo o *M. bovis* que demonstra um alto nível de resistência natural a este fármaco (Konno *et al.*, 1959). A ausência de atividade da pirazinamidase em linhagens de *M. bovis* impede a transformação da PZA em ácido pirazinóico, reforçando a hipótese de que se trata de uma pró-droga que necessita de uma etapa de transformação bioquímica para tornar-se ativa. Estudos *in vitro* comprovaram que isolados de *M. bovis*, são sensíveis ao ácido pirazinóico (Konno *et al.*, 1967).

O gene que codifica a enzima PZAase, o *pncA*, foi identificado em *M. tuberculosis* (Scorpio and Zhang, 1996) e contém 561 pb. O seqüenciamento completo do genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) demonstrou que o gene *pncA* está localizado na posição (2288679...2289239), correspondendo à ORF Rv2043 no genoma desta micobactéria.

Estudos da seqüência de DNA do gene *pncA* de cepas resistentes e sensíveis de *M. tuberculosis* estabeleceram uma estreita associação entre mutações neste gene e a resistência à PZA (Scorpio *et al.*, 1997; Sreevatsan *et al.*, 1997 a; Lemaitre *et al.*, 1999; Martilla *et al.*, 1999; Mestdagh *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2000; Zhang and Mitchison, 2003, Wade *et al.*, 2004; Portugal *et al.*, 2004, Rodrigues *et al.*, 2005). Estes estudos identificaram um grupo diverso de mutações amplamente dispersadas por todo o gene. A maior parte é corresponde a mutações *missense*, porém inserções, deleções e mutações na região regulatória também foram descritas (Ramaswamy and Musser, 1998; Morlock *et al.*, 2000; Zhang and Mitchison, 2003).

Para as cepas com baixo nível de resistência está sendo proposto a investigação de alteração nos mecanismos de captação ou a relação com algum sistema de bomba de efluxo (Scorpio *et al.*, 1997; Zhang and Mitchison, 2003).

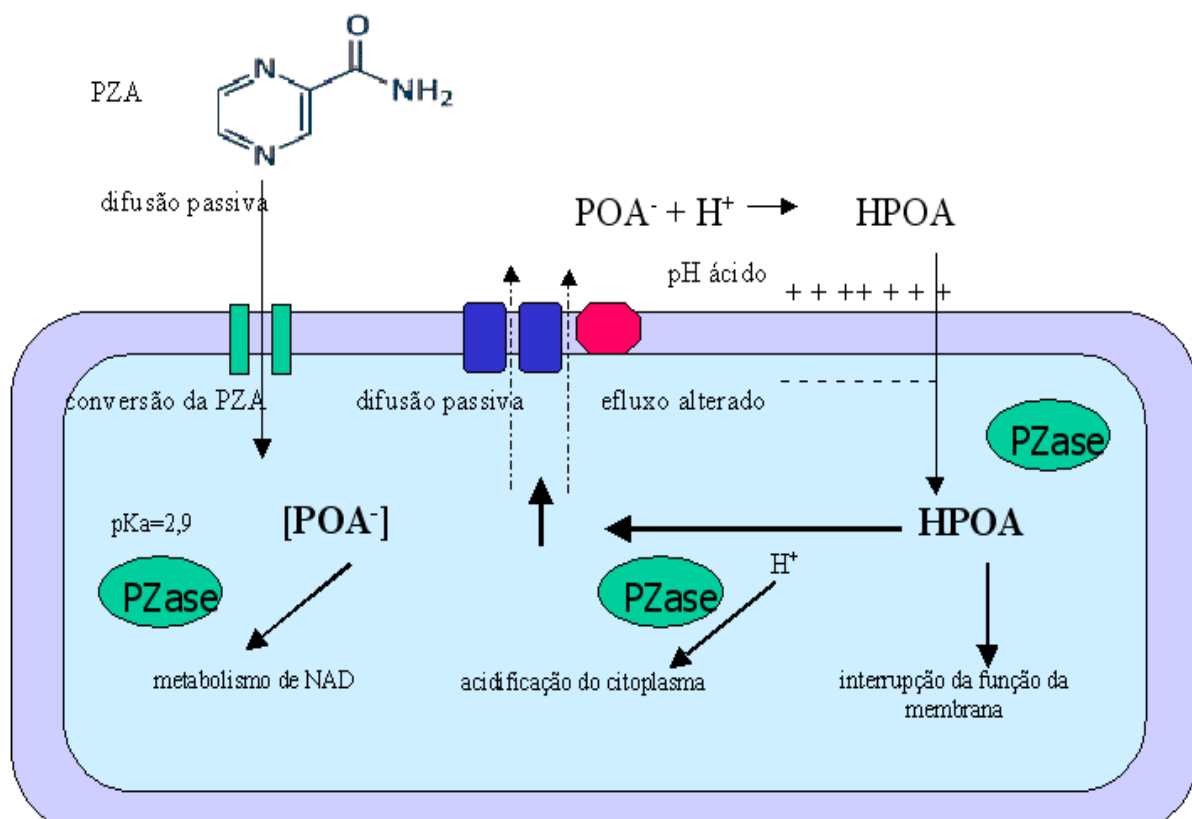


Figura 3- Desenho esquemático do mecanismo de ação da PZA em *M. tuberculosis*. POA= ácido pirazinóico, HPOA= POA protonado. (Baseado em Mitchson & Zhang, 2003).

2.3.4- Mecanismos Moleculares de Resistência a Etambutol

O etambutol (EMB) (Figura 4) é um composto sintético denominado quimicamente de dextro-etilenodiimino-di-1-butanol dihidrocloro descrito por Thomas *et al.*, em 1961, como um fármaco que possui atividade antimicobacteriana. O EMB tem sido considerado um antibiótico de primeira linha no tratamento da tuberculose sendo também usado em infecções com *Mycobacterium avium*, particularmente no caso de pacientes coinfectados com o HIV (Sreevatsan *et al.*, 1997 b; Ramaswamy *et al.*, 2000; Rinder *et al.*, 2001).

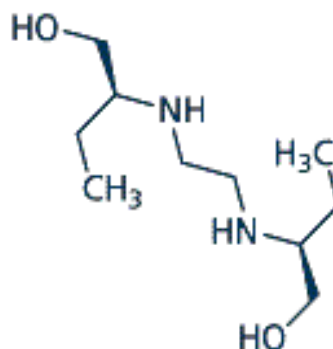


Figura 4- Estrutura do Etambutol

O esclarecimento dos mecanismos de ação do EMB nas micobactérias é muito recente (Figura 5). Apesar das diversas hipóteses sobre o mecanismo de ação deste fármaco, sabe-se que ele atua especificamente sobre a biossíntese da parede celular (Rastoggi *et al.*, 1990; Belanger *et al.*, 1996; Alcaide *et al.*, 1997; Ramaswamy *et al.*, 2000; Zhang and Telenti, 2000; Zhang *et al.*, 2003), inibindo a polimerização da arabinose de arabinogalactanos e de lipoarabinomanoses, (Takayama and Kilburn, 1989; Deng *et al.*, 1995; Mikusov *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2003) os quais servem de ligação para os ácidos micólicos presentes na parede celular de *M. tuberculosis* e de outras micobactérias (Figura 5) (Khoo *et al.*, 1996). Lee e colaboradores sugeriram em 1995, que o principal alvo da droga era a enzima arabinosiltransferase, que tem a função de incorporar ácidos micólicos na parede (Telenti *et al.*, 1997; Ramaswamy *et al.*, 2000). Esta enzima é uma proteína integral de membrana com 12 domínios transmembrana, onde as principais alterações que determinam a resistência ocorrem numa região localizada na alça citoplasmática de EmbB (Ramaswamy and Muser, 1998).

Sendo assim, o EMB tem a função de aumentar a permeabilidade da parede celular, promovendo um acúmulo de ácido micólico e finalmente a morte da célula (Figura 5) (Ramaswamy *et al.*, 2000). A partir desta inibição Belanger *et al.* (1996) observaram o acúmulo de uma substância, o β -D-arabinofuronosil-1-monofosforil decaprenol (DPA), e classificaram-na como um elemento intermediário (doador de arabinosil) na biossíntese de arabinose.

A arabinosiltransferase é codificada pelo operon *embCAB* localizado no genoma de *M. tuberculosis* nas posições 4239860 – 4249807, ORFs Rv3793, Rv3794 e Rv3795 (Cole *et al.*, 1998). Este operon (10 Kb) compreende 3 genes que codificam as enzimas designadas *embC*, *embA* e *embB* (Telenti *et al.*, 1997; Ramaswamy *et al.*, 2000). As bases genéticas para a

resistência ao EMB começaram a ser esclarecidas por experimentos de superexpressão da arabinosiltransferase utilizando-se um vetor plasmidial. Estudos baseados no seqüenciamento do operon *embCAB* de *M. tuberculosis* demonstraram a ocorrência de mutações nesta região, que podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de resistência destes organismos a EMB (Sreevatsan *et al.*, 1997b; Ramaswamy *et al.*, 2000). Mutações no gene *embB*, mais especificamente no códon 306, uma região conservada que codifica uma metionina, parece ser a maior responsável por resistência ao etambutol observada em *M. tuberculosis* (Telenti *et al.*, 1997b; Sreevatsan *et al.*, 1997 b; Alcaide *et al.*, 1997 Ramaswamy *et al.*, 2000; Rinder *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2003).

Ramaswamy *et al.* (2000) identificaram polimorfismos em cepas resistentes a EMB em várias posições do operon *embCAB* sendo a maioria localizada no gene *embB*. Os autores concluíram que este gene pode apresentar mutações em múltiplos códons que resultam em dois, três ou quatro aminoácidos diferentes na proteína EmbB. Apesar de encontrarem 11 mutações em códons diferentes, as mais freqüentes foram demonstradas no códon 306 de *embB*.

arabinolactanos
Ácidos
micólicos

lipoarabinomanoses

polimerização
de arabinose

embCAB

arabinosiltransferase

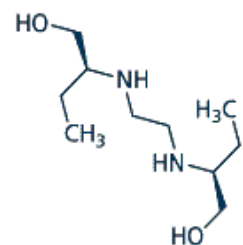


Figura 5- Desenho esquemático do mecanismo de ação do EMB em *M. tuberculosis*

2.4 - Testes disponíveis para detecção de resistência

O teste da sensibilidade da micobactéria às drogas anti-tuberculose, tanto pode ser feito para fornecer informações úteis para a definição do esquema terapêutico de um indivíduo, como para o planejamento das estratégias de tratamento em larga escala. Além disso, o monitoramento da resistência é um importante indicador da efetividade de um programa de controle da tuberculose. Há três métodos clássicos para testar a susceptibilidade do bacilo tuberculoso às drogas no meio Löwenstein Jensen (LJ): o da concentração absoluta, o da razão de resistência e o das proporções. O teste de sensibilidade às drogas mais utilizado e confiável para a identificação de bacilos resistentes tem sido o método das proporções (Canetti *et al.*, 1963), que necessita da cultura do bacilo, sendo, portanto, bastante demorado (oito a dez semanas após o isolamento da bactéria) (Bergman and Woods *et al.*, 1998).

Porém, outros métodos podem ser utilizados para a detecção de resistência em *M. tuberculosis*, considerando que existem técnicas classificadas como padrão e que são mais amplamente usadas nos laboratórios. Podemos classificar os testes em 2 tipos: fenotípicos e genotípicos.

Todas as metodologias fenotípicas estão sendo utilizadas de alguma maneira no Brasil, sendo que algumas estão na fase de validação e outras, por sua vez, já podem ser utilizadas como rotina num laboratório de bacteriologia da tuberculose. Contudo, é importante lembrar que o método das proporções é o recomendado e que as demais metodologias podem ser realizadas paralelamente. Em relação aos métodos semi-automatizados, ainda são

necessários estudos de custo efetividade para avaliar a aplicabilidade dos mesmos no sistema de saúde pública.

As metodologias genotípicas apesar de sofisticadas não podem ser utilizadas de modo isolado no diagnóstico de um laboratório de rotina, pois sempre é necessário realizar o método das proporções em paralelo. Contudo, o uso de técnicas de biologia molecular proporciona resultados que possibilitam maior rapidez para iniciar o tratamento diminuindo a morbidade e mortalidade e também evitando a disseminação de cepas resistentes no meio ambiente.

2.4.1- Metodologias fenotípicas

A resistência pode ser definida como a diminuição, *in vitro*, da susceptibilidade do *M. tuberculosis*, em relação a cada fármaco (Heifets, 2000), comparada com a cepa selvagem (que nunca teve contato com o fármaco). Para que dados referentes à resistência, em estudos epidemiológicos, sejam considerados válidos, é preciso que os testes de laboratório estejam padronizados quanto aos meios de cultura e as condições de realização destes testes, assim como a expressão dos resultados (Canetti *et al*, 1963). Há um esforço para que os laboratórios que realizam testes de susceptibilidade façam parte de uma rede mundial, o que assegura a qualidade dos resultados (WHO, 1997b; Lazlo *et al*, 1997).

A seguir serão apresentados alguns dos métodos existentes para se detectar *M. tuberculosis* resistentes.

Método das Proporções: padronizado por Canetti em 1963, é um método manual, que consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes presentes em uma amostra de *M.*

tuberculosis frente a uma concentração do fármaco que é capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis, mas não as células resistentes, a concentração crítica (Tabela 3). A cultura é feita no meio sólido LJ a base de ovo. No Brasil esta é a metodologia recomendada pelo Ministério da Saúde para ser utilizada na rotina dos laboratórios de Bacteriologia da Tuberculose. Esta metodologia é sensível, de baixo custo, porém fornece resultados somente depois de 60 dias, e é considerada “padrão ouro” para detecção de resistência em *M. tuberculosis*.

Tabela 3- Concentração crítica das drogas empregada no teste de susceptibilidade de MTB e proporção crítica de mutantes resistentes

Fármaco	Concentração (µg/ml)	Proporções (%)
Isoniazida (INH)	0,2	1,0
Rifampicina (RMP)	40,0	1,0
Pirazinamida (PZA)	100,0	10,0
Estreptomicina (SM)	4,0	10,0
Etambutol (EMB)	2,0	1,0
Etionamida (ETH)	20,0	10,0

BACTEC 460:, disponibilizado no mercado na década de 80 pela empresa Becton and Dickinson Instruments System, o aparelho detecta CO₂ radioativo liberado pela utilização de C¹⁴ do ácido palmítico, presente no meio de cultura líquido a base Agar (7H12A e 7H12B), consumido pela micobactéria. Esta metodologia é sensível e fornece resultados em até 14 dias, porém utiliza material radioativo (de difícil descarte), é onerosa e depende de um aparelho importado. O método apresenta entre 95 a 97% de concordância com o método das proporções.

No Brasil este aparelho já está sendo utilizado (Siddiqi *et. al.*, 1981; Cornfield *et. al.*; 1997; Barreto *et. al.*, 2002).

BACTEC-MGIT 960: disponibilizado recentemente no mercado pela empresa Becton and Dickinson Instruments System, é um aparelho mais moderno que não utiliza material radioativo, pois o meio de cultura a base de Agar (7H12A e 7H12B) é feito com composto fluorescente. Após 14 dias o crescimento do microrganismo é visualizado por espectrofotometria. A metodologia é sensível, porém onerosa e depende de aparelho importado além de encontrar-se em fase de validação (Pyffer *et. al.*, 1999; Tortoli *et. al.*, 2002, Koskela *et al.*, 2003).

MODS (*Microscopic Observation Broth Drug Seseptibility Assay*): metodologia manual realizada em meio líquido (7H9) em microplacas, que depois de 10 dias podem ser observadas no microscópio invertido com filtro para campo escuro para visualizar o fator corda formado pela micobactéria. É uma metodologia simples, fácil de ser implantada num laboratório. Esta metodologia está sendo testada no Brasil para validação (Caviedes *et. al.*, 2000, Park *et al.*, 2002).

D29-PhaB Assay: Metodologia manual realizada em meio líquido (7H9). Baseia-se na capacidade do micobacteriófago (fago) de infectar as células, quando a micobactéria é resistente aos fármacos. Quando o fago infecta as células ele consegue lisar a parede celular detectando resistência. É uma metodologia trabalhosa, que requer muita paciência e habilidade. No Brasil está sendo testada para validação (Mcnemey, 1999, Galí *et al.*, 2003).

Método de detecção de microcolônias-*Thin Layer*: metodologia que utiliza meio sólido a base de Agar (7H11) em placas de Petri., onde é inoculada a cultura de micobactéria.

Depois de 10 dias as microcolônias são observadas no microscópio comum. Este método é rápido e fácil de ser realizado, no Brasil está sendo testado para validação (Mejia *et al.*, 1999).

E-Test-Epsilon: metodologia quantitativa da concentração inibitória mínima (MIC) das drogas. É uma metodologia manual, que utiliza meio sólido a base de Agar (7H11) e fitas impregnadas com um gradiente de concentração de droga. Depois de 5 a 7 dias, a leitura é feita através da elipse formada no meio de cultura. Este método é fácil, mas as fitas são importadas o que o torna caro. O teste vem se mostrando reprodutível e de fácil execução (Hazbon *et al.*, 2000, Feixo *et al.*, 2002).

MIC: metodologia quantitativa da concentração inibitória mínima (MIC) da droga também pode ser realizada em microplacas, utilizando meio líquido a base de Agar (7H9), onde a visualização do resultado se dá através da utilização de um corante que pode ser Alamar Blue ou Brometo de tetrazolium (MTT). Esta metodologia é manual e trabalhosa, pois é necessário o uso de corantes importados. No Brasil está sendo testada para validação (Mshana *et al.*, 1998, Palomino and Portaels, 1999;).

2.4.2- Metodologias genotípicas

São metodologias baseadas na detecção de resistência utilizando o DNA da micobactéria (Palomino, 2000). Nos últimos anos a genética, bem como a biologia molecular tem sido ferramentas importantes para o estudo dos microrganismos, assim como o estudo da resistência aos fármacos. O estudo dos mecanismos moleculares de resistência aos agentes antimicrobianos tem como resultados o desenvolvimento de alguns ensaios de genotipagem rápida para detecção de resistência aos fármacos.

Para a realização destes experimentos a estratégia principal tem sido a amplificação enzimática de uma região específica do genoma do *M. tuberculosis* e a análise do produto amplificado para determinar mutações que podem resultar em resistência aos fármacos, através de várias metodologias que já estão sendo utilizadas pelo Brasil.

Seqüenciamento: metodologia que analisa todos os nucleotídeos da região de DNA específica escolhida do genoma. Por esta análise e comparação da seqüência do gene de uma cepa selvagem com a de uma cepa resistente é possível identificar mutações na cepa resistente que podem estar relacionadas com a resistência a determinado fármaco. É uma metodologia muito sensível, eficaz e confiável e é considerada “padrão-ouro” quando se trata de diagnóstico por técnicas de biologia molecular. Entretanto, é extremamente onerosa, pois utiliza aparelhos importados de altíssimo custo. Esta metodologia está disponível no Brasil somente em laboratórios de pesquisa e/ou de referência (Soini and Musser, 2001).

PCR-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*): a metodologia utiliza a análise do produto de amplificação da região de DNA de interesse do genoma da micobactéria num gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. O padrão das bandas que aparece neste gel permite a identificação de alterações nas regiões genômicas amplificadas, que levam a mudanças conformacionais e diferenças no comportamento durante a eletroforese. A identificação dos genes envolvidos com a resistência é possível pela análise comparativa dos padrões observados na cepa selvagem e na cepa resistente. Este método também é rápido (24 horas) e fácil de analisar. Entretanto, esta metodologia utiliza reagentes tóxicos e não fornece um resultado preciso e confiável (Telenti *et. al.*, 1993a).

DNA-Microarrays: metodologia baseada na análise de regiões mutadas através de um padrão estabelecido por um *chip* de DNA. O sistema é composto de uma matriz com várias

sondas de DNA fixadas, que posteriormente serão hibridizadas e analisadas. A visualização do resultado se dá através de uma combinação de cores que indica o que está mutado e o que tem padrão selvagem. Este método é rápido e eficiente, porém requer um pessoal experiente, e tem alto custo devido ao equipamento importado. Este teste ainda não foi validado (Gingeras *et. al.*, 1998; Kivi *et. al.*, 2002).

3- JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O Laboratório Central do Rio Grande do Sul (LACEN/RS) juntamente com o Centro de Biotecnologia da UFRGS vem desenvolvendo trabalhos visando o estabelecimento de novas metodologias para o diagnóstico da tuberculose. Esta colaboração possibilitou até o momento a implantação de um método diagnóstico para detecção de tuberculose causada por *M. tuberculosis* (Rossetti *et al.*, 1997) e por *M. avium* (Rodrigues *et al.*, 2002), os quais vêm sendo amplamente utilizados na rede de saúde pública.

Trabalhos baseados em caracterização de alterações genômicas de *M. tuberculosis* que estão envolvidas na resistência deste organismo às drogas, mais especificamente rifampicina (RIF) (Valim *et al.*, 2000), isoniazida (INH) (Silva, *et al.*, 2003) e pirazinamida (Rodrigues *et al.*, 2005) também vêm sendo desenvolvidos no LACEN/RS visando beneficiar os programas de controle da tuberculose.

Sendo assim, com o aumento da transmissão ativa de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes às drogas, tanto no Rio Grande do Sul quanto em outras regiões do Brasil, e, buscando dar continuidade aos avanços até aqui obtidos, fez-se necessário um estudo relativo à resistência de *M. tuberculosis* à pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB).

Sabe-se até o momento que existem genes específicos que, possivelmente sejam alvos de alterações e podem proporcionar resistência em *M. tuberculosis*, no entanto ainda não se têm relatos do tipo e da frequência destas mutações nos isolados do nosso Estado e de outros locais do Brasil.

Após este estudo, será possível avaliar a ocorrência das mutações nos genes específicos e inferir sobre a possível interferência das mesmas nos mecanismos relacionados

com a resistência a essas drogas. Conhecendo melhor os isolados de nosso país, poderemos fornecer informações para o desenvolvimento de um melhor método de detecção da resistência. Este método, depois de adequadamente testado poderá colaborar de forma decisiva nos programas de controle da tuberculose.

4-OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo identificar mutações nos genes *pncA* e *embB* de *M. tuberculosis* relacionadas com a resistência à pirazinamida e/ou etambutol, respectivamente, bem como determinar a frequência destas mutações nos isolados resistentes à estas drogas provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo. Desta forma, será possível o desenvolvimento de novas estratégias para caracterização de resistência e a orientação de uma terapia mais eficaz aos pacientes, bem como conhecer mais sobre os mecanismos que conferem resistência ao *M. tuberculosis* em cada região geográfica, contribuindo para o mapeamento da resistência no Brasil e no mundo.

4.1-Objetivos específicos

- Analisar regiões do genoma já caracterizadas como possíveis responsáveis pela resistência a pirazinamida (*pncA*) e etambutol (*embB*) em *M. tuberculosis* isolados no Rio Grande do Sul e São Paulo.
- Investigar outras possíveis alterações moleculares relacionadas com a resistência aos antituberculostáticos mencionados.
- Comparar a existência de mutações no gene *embB* com as CMI_s de EMB encontradas em isolados resistentes.
- Comparar a existência de mutações no gene *pncA* com a atividade da pirazinamidase nos isolados resistentes à pirazinamida.

- Verificar a relação entre os isolados que possuem a mesma alteração gênica através das técnicas de spoligotyping e *Double-Repetitive-Element* PCR (DRE-PCR).

5- MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada para a identificação das alterações nos genes *pncA* e *embB* de *M. tuberculosis* envolveu várias etapas. As mesmas encontram-se esquematizadas no fluxograma de trabalho (Anexo1).

5.1- Local de desenvolvimento do estudo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CDCT da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul – FEPPS, em Porto Alegre; e no Centro de Biotecnologia do Estado do RS da Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS. Também houve colaboração do Laboratório de Tuberculose do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.

5.2- Seleção da amostra

Os isolados utilizados neste estudo foram selecionados de acordo com a disponibilidade e viabilidade da cultura dos mesmos. A amostragem contou com isolados de *M. tuberculosis* pertencentes ao Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose do LACEN/RS e do Laboratório de Tuberculose do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.

5.3- Critérios de Inclusão

As cepas foram isoladas de cultura de amostras clínicas, com identificação bioquímica compatível com *M. tuberculosis* e resistentes a pirazinamida e/ou etambutol por 2 tipos de Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA).

Os isolados do RS foram identificados pelo método das proporções (Canetti, 1963), enquanto os provenientes do Estado de SP foram isoladas pelo método denominado *Resistance Ratio* (Collins, *et al.*, 1997). Cerca de 10 isolados sensíveis à todas as drogas, de cada Estado, foram incluídos como controle.

5.4- Número amostral

O estudo analisou uma amostragem de 117 isolados de *M. tuberculosis* resistentes à PZA e/ou EMB, sendo 42 destes provenientes do Rio Grande do Sul e 75 de São Paulo.

Tabela 4. Perfil de susceptibilidade dos isolados de *M. tuberculosis* determinado pelos testes convencionais

Susceptibilidade	Número de isolados
Sensíveis à PZA e EMB	38 (19 PZA e 19 EMB)
Resistentes à PZA	40
Resistentes à EMB	39
TOTAL	117

5.5- Amostras clínicas e cultura de *M. tuberculosis*

As amostras clínicas utilizadas para culturas de *M. tuberculosis* foram colhidas nos Laboratórios Regionais de Saúde Pública, e nos Centros de Saúde de Referência para tuberculose de Porto Alegre e de São Paulo. Este material foi cultivado em meio Löwenstein Jensen e incubado à 37°C de 4 a 6 semanas. Os testes convencionais de sensibilidade foram realizados conforme descrito no Manual de Bacteriologia da Tuberculose (1995).

5.6- Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Para os isolados do Estado do Rio Grande do Sul tiveram seu perfil de resistência determinado após o cultivo primário ser submetido ao TSA pelo Método das Proporções padronizado por Canetti (1963). Para este método foram utilizados os seguintes fármacos: rifampicina (40µg/ml), isoniazida (0,2µg/ml), estreptomicina (4µg/ml), etambutol (2µg/ml), pirazinamida (100µg/ml) e etionamida (20µg/ml). Foram utilizadas as proporções críticas da população bacteriana indicadoras de resistência: em isoniazida (INH) 1%, rifampicina (RMP) 1%, estreptomicina (SM) 10%, etambutol (EMB) 1%, etionamida (ETH) 10% e pirazinamida (PZA) 10%.

Os isolados provenientes de São Paulo, o perfil de resistência foi determinado pelo Método da Taxa de Resistência (*Resistance Ratio*) padronizado por Collins *et al.*(1997). Este método compara a resistência dos isolados de pacientes com uma cepa padrão de laboratório. São feitos conjuntos de tubos com meio apropriado, contendo diluições dobradas da droga onde

são inoculados tanto o isolado desconhecido (do paciente), quanto o conhecido (da cepa padrão) e espera-se o crescimento do bacilo.

A resistência é expressa pela relação da concentração inibitória mínima (CMI) do teste (o paciente) dividida pelo CMI das cepas padrão sensível.

5.7- Determinação da concentração inibitória mínima (CMI)

A concentração inibitória mínima (CMI) do etambutol para o crescimento de *M. tuberculosis* foi estabelecida usando microplacas, meio líquido e indicador redox de viabilidade celular (Alamar Blue™). Os procedimentos utilizados seguiram a adaptação das técnicas propostas por Franzblau *et al* (1998); Palomino and Portaels, (1999) e Caviedes *et al.* (2002). Isolados com CMI maior ou igual à 2µg/ml foram considerados resistentes a EMB e abaixo deste valor, sensíveis.

O teste de CMI para PZA não foi realizado, sendo estes isolados classificados como resistentes através do teste de atividade da pirazinamidase.

5.8- Teste de atividade da pirazinamidase

A atividade da pirazinamidase foi avaliada conforme protocolo proposto por Wayne and Doubek (1968). O teste tem o propósito de discriminar cepas de *M. tuberculosis* resistentes e sensíveis à PZA através de um anel rosado ou vermelho que se forma na superfície do ágar no

caso da cepa estar com a enzima ativa. A não atividade da enzima inabilita o organismo de converter PZA em ácido pirazinóico (POA), considerado tóxico para a bactéria.

A enzima pirazinamidase hidrolisa a pirazinamida para amônia e ácido pirazinóico, o qual pode ser detectado pela adição de sulfato ferroso de amônia. Este teste é mais usado para separar *M. marinum* de *M. kansasii* e *M. bovis* de *M. tuberculosis*. O mecanismo de resistência à PZA de *M. tuberculosis* inabilita o organismo de produzir ácido pirazinóico, o qual assumidamente é o componente ativo da PZA. A pirazinamidase negativa sugere a resistência da micobactéria à PZA.

5.9- Extração de DNA

A partir de cepas de *M. tuberculosis*, isoladas por cultura, foi realizada a extração do DNA conforme técnica descrita por van Soolingen *et al.* (1994). Neste processo a massa bacteriana (uma alçada) era transferida para um tubo de microcentrífuga com 400 µL de TE 1X e em seguida colocada em banho-maria a 80°C por 20 min para matar todas as células. A lise bacteriana foi realizada através da adição de 50 µL de lisozima a 10 mg/mL seguida da agitação em agitador automático do tipo vortex e incubação durante a noite a 37°C seguindo da adição de 75 µL de uma solução de SDS 10%/Proteinase K e incubação em banho-maria a 65°C por 10 min. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e 100 µL de CTAB 10%/NaCl 4% (solução pré-aquecida a 65°C) a mistura foi agitada novamente e incubada em banho-maria a 65°C por 10 min. Nesta etapa a mistura assumiu uma forma leitosa, onde foi adicionado 750 µL da solução de clorofórmio álcool isoamílico 24:1 seguido de homogeneização e centrifugação por 5 min a 12.000 g. Depois da centrifugação o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de

microcentrifuga, e 0,6 volumes de isopropanol foi adicionado, para que houvesse a precipitação dos ácidos nucleicos. Este conteúdo foi incubado a -20°C por 30 min. Após a incubação foi realizada uma nova centrifugação de 15 min a 12.000 g, onde o sobrenadante foi removido e adicionado de 1 mL de etanol 70% gelado para lavagem do resíduo de DNA. Uma segunda centrifugação de 5 min a 12.000 g foi feita, o etanol novamente removido, e o DNA submetido à secagem por 30 min a temperatura ambiente. Depois de seco, foram adicionados 30 μL de TE 1X. O DNA extraído foi mantido a 4°C pelo menos por dois dias para suspensão completa e em seguida estocado a -20°C . O produto da extração foi analisado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (EtBr) e visualizado em transiluminador U.V.

5.10- Amplificação dos genes de interesse

As principais alterações moleculares descritas para a região do gene *embB* e para o gene *pncA*, relacionadas com a resistência ao etambutol e a pirazinamida respectivamente, foram analisadas por seqüenciamento automático.

As seqüências selecionadas *primers* basearam-se nas regiões gênicas identificadas como responsáveis pela resistência a PZA e EMB. A reação de PCR para amplificar seqüências de DNA de isolados de *M. tuberculosis* resistentes à pirazinamida foi realizada com base nos *primers* descritos por Scorpio *et al.*, 1997. Para os isolados resistentes à etambutol, os *primers* seguiram as seqüências descritas por Ramaswamy *et al.* (2000).

5.10.1- Primers utilizados

Para determinar a seqüência do gene *pncA*, foram amplificadas duas regiões que perfazem um total de 720 pb. Dois pares de *primers* foram utilizados para a amplificação destas regiões. Os denominados por P1-F e P1-R, amplificam um fragmento de 380 pb, que inicia 80 pb *upstream* do códon de iniciação e termina no códon 90. Este fragmento contém a região promotora do gene. Um segundo fragmento (350 pb) foi amplificado pelos *primers* P2-F e P2-R iniciando no códon 84 do gene *pncA* e terminando 70 pb *downstream* do códon de terminação do gene (Scorpio *et al.*, 1997), (Figura 6).

P1-F (5'- GTC GGT CAT GTT CGC GAT CG -3')

P1-R (5'- GAT TGC CGA CGT GTC CAG AC -3')

P2-F (5'- GTC TGG ACA CGT CGG CAA TC -3')

P2-R (5'- GCT TTG CGG CGA GCG CTC CA -3')

Para determinar a seqüência do gene *embB*, foram utilizados *primers* internos ao gene que amplificam uma região de 803 pb onde podem ser encontrados os códons com maior freqüência de mutações (Ramaswamy *et al.*, 2000) (Figura 6).

E1-F (5'-GGTGCGCGCCATGCCACC-3')

E1-R (5'-GGATGCGCCTGCCAGACC-3')

Gene *embB* de *M. tuberculosis* (803 pb)

7201 GCCGTGCGAC GTGGTGGCGG **CCATGCCACC** CGCGGGCGGG GTGGTGTCTGG GCACCGCACC
 7261 CAAGCAAGGC AAGGACGCCA ATTTGCAGGC GTTGTTCGTC GTCGTCAGCG CCCAGCGCGT
 7321 GGACGTCACC GACCGCAACG TGGTGATCTT GTCCGTGCCG CGCGAGCAGG TGACGTCCCC
 7381 GCAGTGTCAA CGCATCGAGG TCACCTCTAC CCACGCCGGC ACCTTCGCCA ACTTCGTCGG
 7441 GCTCAAGGAC CCGTCGGGCG CGCCGCTGCG CAGCGGCTTC CCCGACCCCA ACCTGCGCCC
 7501 GCAGATTGTC GGGGTGTTC ACGACCTGAC CGGGCCCGCG CCGCCCGGGC TGGCGGTCTC
 7561 GCGGACCATC GACACCCGGT TCTCCACCCG GCCGACCACG CTGAAACTGC TGGCGATCAT
 7621 CGGGGCGATC GTGGCCACCG TCGTCGCACT GATCGCGTTG TGGCGCCTGG ACCAGTTGGA
 7681 CGGGCGGGGC TCAATTGCCC AGCTCCTCCT CAGGCCGTTT CGGCCTGCAT CGTCGCCGGG
 7741 CGGCATGCGC CGGCTGATTC CGGCAAGCTG GCGCACCTTC ACCCTGACCG ACGCCGTGGT
 7801 GATATTCGGC TTCCTGCTCT GGCATGTCAT CGGCGCGAAT TCGTCGGACG ACGGCTACAT
 7861 CCTGGGCATG GCCCGAGTCG CCGACCACGC CGGCTACATG TCCAACTATT TCCGCTGGTT
 7921 CGGCAGCCCG GAGGATCCCT TCGGCTGGTA TTACAACCTG CTGGCGCTGA TGACCCATGT
 7981 CAGCGACGCC AGTCTGTGGA **TGCGCCTGCC** **AGACCT**TGGCC

← **E1-R**

Gene *pncA* de *M. tuberculosis* (561 pb)

p1F 80 pb upstream

GTCGGTCATGTTTCGCGATCG

1 ATGCGGGCGT TGATCATCGT CGACGTGCAG AACGACTTCT GCGAGGGTGG CTCGCTGGCG
 61 GTAACCGGTG GCGCCGCGCT GGCCCGCGCC ATCAGCGACT ACCTGGCCGA AGCGGCGGAC
 121 TACCATCACG TCGTGGCAAC CAAGGACTTC CACATCGACC CGGGTGACCA CTTCTCCGGC
 181 ACACCGGACT ATTCTCGTC GTGGCCACCG CATTGCGTCA GCGGTACTCC CGGCGCGGAC
 241 TTCCATCCCA **GTCTGGACAC** **GTCGGCAATC** GAGGCGGTGT TCTACAAGGG TGCCTACACC
 301 GGAGCGTACA GCGGCTTCGA AGGAGTCGAC GAGAACGGCA CGCCACTGCT GAATTGGCTG
 361 CGGCAACGCG GCGTCGATGA GGTCGATGTG GTCGGTATTG CCACCGATCA TTGTGTGCGC
 421 CAGACGGCCG AGGACGCGGT ACGCAATGGC TTGGCCACCA GGGTGTCTGGT GGACCTGACA
 481 GCGGGTGTGT CGGCCGATAC CACCGTCGCC GCGCTGGAGG AGATGCGCAC CGCCAGCGTC
 541 GAGTTGGTTT GCAGCTCCTG ATGGCACCGC CGAACC

← **P1R**

P2F →

GCTTTGCGGCGAGCGCTCCA

70 pb downstream **P2R**

Figura 6- Posicionamento dos *primers* utilizados na amplificação do gene *pncA* e do fragmento do gene *embB*.

5.10.2- Condições da PCR

Amplificação do gene *pncA* - Os fragmentos foram amplificados em uma reação contendo: 3,0 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 2,5U Taq DNA polimerase, 40 pmol de cada primer e 60 ng de DNA, em um volume total de 100 µl.

Amplificação do gene *embB* - Este fragmento foi amplificado em uma reação com 3,0 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 2,5U Taq DNA polimerase, 10 µl de PCRx Enhancer Solution (melhorador da reação), 40 pmol de *primers* e 100 ng de DNA em um volume total de 100 µl.

Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador obedecendo as seguintes temperaturas e tempos:

<i>pncA</i>		<i>embB</i>	
1 min - 95 °C	1X	3 min - 94 °C	1X
1 min - 95 °C		1 min - 94 °C	
1 min - 68 °C	30 X	1 min - 68 °C	30 X
1 min - 72 °C		1 min - 72 °C	
		5 min - 72 °C	1X

5.11- Análise dos fragmentos amplificados

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com 5µg/mL de brometo de etídeo (EtBr) e exposto a um transiluminador UV.

5.12- Purificação dos fragmentos amplificados

Os fragmentos obtidos após a amplificação por PCR foram purificados seguindo o protocolo do kit MicroSpin™ S-300 HR Columns (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

5.13- Seqüenciamento automático

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, purificados com MicroSpin™ S-300 HR Columns e posteriormente seqüenciados em um seqüenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) usando Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit com AmpliTaq® DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). É importante ressaltar que as regiões de interesse de cada isolado de *M. tuberculosis* foram amplificadas e seqüenciadas pelo menos 3 vezes para confirmação da seqüência correta.

As reações de seqüenciamento foram feitas com 3 µl de tampão 5X preparado com: 2 mL de Tris-HCl 1 M ajustado para pH 9,0 e 1 mL de MgCl₂ 50 mM em volume final de 10 mL, 2 µl de BigDye, 3,2 pmol de primer e 100 ng – 150 ng de DNA purificado, com volume final de 20 µl,

em um termociclador obedecendo as seguintes temperaturas e tempos: 10 seg a 95 °C, 5 seg a 50°C e 3 min a 60°C por 25 ciclos.

5.13.1- Precipitação dos produtos para seqüenciamento

Foram adicionados 80 µl de isopropanol 75% ao produto gerado após a reação de sequenciamento, esta mistura foi incubada por 15 min à temperatura ambiente e centrifugada por 30 min à 14.000 g. O sobrenadante foi desprezado e no tubo eram adicionados 200 µl de etanol 70%, foi feita uma agitação de 3-5 seg e após foi feita centrifugação novamente por 5 min à 14.000 g. O sobrenadante foi retirado e os tubos submetidos à secagem em um bloco quente por 2 min à 90°C. Após a secagem, os tubos permaneciam à -20°C por pelo menos 24 horas. A eluição do produto foi feita com 10 µl de formamida.

5.13.2- Análise das seqüências

Os resultados foram analisados através do programa CHROMAS “versão 1.45” e comparados com as seqüências depositadas no GenBank (acesso U59967 e U68480) usando BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool).

5.14- Genotipagem dos isolados

Todos os isolados de *M. tuberculosis*, que apresentaram o mesmo tipo de alteração genômica foram tipificados pelas técnicas de spoligotyping e DRE-PCR.

5.14.1- Spoligotyping

A técnica foi realizada conforme padronizado por Kamerbeek *et al.*, 1997 e está descrita nas etapas a seguir:

5.14.1.1- Primers

Os *primers* DRa e DRb anelam nas extremidades da seqüência DR visando amplificar as seqüências espaçadoras entre duas DRs (Kamerbeek *et al.*, 1997).

Dra: (5' biotilado) 5'- GGT TTT GGG TCT GAC GAC -3'

DRb: 5'- CCG AGA GGG GAC GGA AAC - 3'

5.14.1.2- Reação de Amplificação

As reações foram realizadas com 50 a 100 ng de DNA, 20 pmoles de cada um dos *primers*, 200 µM de desoxiribonucleosídeos trifosfato (Invitrogen™ Life Technologies), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase recombinante (Invitrogen™ Life Technologies). As amplificações pela PCR foram realizadas em um termociclador (Mini Cycler - MJ Research) sob as seguintes condições: 1 ciclo a 96°C por 3 min, 20 ciclos a 96°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 30 seg e 1 ciclo final a 72°C por 5 min.

5.14.1.3- Hibridização dos Produtos da PCR e Detecção

Os produtos amplificados foram hibridizados com um conjunto de 43 oligonucleotídeos imobilizados em uma membrana comercial previamente preparada, cada um correspondendo a uma das seqüências únicas dos espaçadores dentro do locus DR (Isogen, Bioscience BV, Holanda).

Para a hibridização, 20 µL dos produtos da PCR foram diluídos em 150 µL de SSPE 2X (0,02 M Na₂HPO₄ * 2 H₂O, 0,36 M NaCl, 2mM EDTA – pH 7,4)– SDS 0,1% e desnaturados. As amostras diluídas foram aplicadas em canais paralelos de um *miniblotter* (Isogen, Bioscience BV, Holanda), de modo que ficassem perpendiculares às linhas de oligonucleotídeos previamente imobilizados. A hibridização foi realizada por 60 min a 60°C em forno giratório (Hybaid Instruments, Holbrook, NY, USA), e a membrana foi lavada 2 vezes em 250 mL de SSPE 2X- SDS 0,5% por 10 min a 60°C. Em seguida foi incubada com um conjugado de estreptavidina-peroxidase diluído (1:4.000) por 50 min a 42°C. A membrana foi lavada 2 vezes em 250 mL de SSPE 2X- SDS 0,5% por 10 min a 42°C e 2 vezes com 250 mL de SSPE 2X por 5 min à temperatura ambiente.

A detecção foi realizada pela sensibilização de um filme autoradiográfico através de uma reação de quimioluminescência, utilizando o kit ECLTM (Amersham Biosciences, Inglaterra).

5.14.2- DRE-PCR

A técnica foi baseada naquela descrita por Friedman *et al.* (1995), com algumas modificações (Cafrune, 2003). As modificações foram:

Utilização de DNA purificado pelo método de CTAB;- Inclusão de DMSO 6% na reação de amplificação;- Aumento da quantidade de *primers* utilizada;- Aumento do número de ciclos de amplificação;- Aumento do tempo de extensão.

5.14.2.1- Primers

Os *primers* Ris1 e Ris2 anelam nas extremidades direita e esquerda, respectivamente, do IS6110. Os *primers* Pntb1 e Pntb2 anelam nas extremidades direita e esquerda, respectivamente, do PGRS conforme descrito por Friedman *et al.* (1995).

Ris 1- 5' GGC TGA GGT CTC AGA TCA G- 3'

Ris 2- 5' ACC CCA TCC TTT CCA AGA AC- 3'

Pntb 1- 5' CCG TTG CCG TAC AGC TG- 3'

Pntb 2- 5' CCT AGC CGA ACC CCT TG- 3'

5.14.2.2- Reação de Amplificação

As reações foram realizadas com 50 a 100 ng de DNA, 50 pmoles de cada um dos 4 *primers*, 200 µM de desoxinucleosídeos trifosfato (Invitrogen™ Life Technologies), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase recombinante (Invitrogen™ Life Technologies) e DMSO 6%. As amplificações pela PCR foram realizadas em um termociclador (Mini Cycler - MJ Reasearch) sob as seguintes condições: 1 ciclo a 94°C por 10 min, 35 ciclos a 94°C por 1 min, 56°C por 2 min, 72°C por 2 min e 1 ciclo final a 72°C por 7 min.

5.14.2.3- Detecção dos Fragmentos Amplificados pela PCR

Após eletroforese, os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2,0%, corado com brometo de etídio, sob iluminação ultravioleta. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o 100 pb *ladder* (Invitrogen™ Life Technologies).

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da caracterização dos isolados resistentes à PZA foram publicados em um artigo na revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (AAC), em janeiro de 2005, o qual pode ser visualizado no anexo 3 deste trabalho.

6.1- Perfil de susceptibilidade dos isolados de *M. tuberculosis* pelos testes convencionais

Através do método das proporções e do *resistance ratio*, como descrito anteriormente em material e métodos, o perfil de susceptibilidade de cada isolado foi determinado para PZA e EMB. Dentre os 117 isolados analisados, 38 foram sensíveis e 79 resistentes, sendo 40 PZA-R e 39 EMB-R (Tabela 4).

6.2- Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para EMB

Como descrito anteriormente em material e métodos, a CMI para PZA não foi determinada. No entanto, os valores obtidos para os isolados resistentes à EMB foram variáveis. Dentre os 58 isolados analisados, todos os 19 sensíveis tiveram $CMI < 1$, porém entre os resistentes foram encontrados 24 isolados que apresentaram $CMI \geq 1$ com valores variáveis (1, 4, 8, 16, 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$) e 15 com valor < 1 com valores variáveis (0,25 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 5).

Tabela 5 Distribuição dos isolados de *M. tuberculosis*, em relação aos valores de CMI para EMB

Testes convencionais	Concentrações de EMB µg/mL								
	64	32	16	8	4	1	<1	0.5	0.25
39 isolados resistentes	04	06	05	06	01	02		04	11
19 isolados sensíveis							19		

6.3- Padronização das condições de amplificação por PCR para caracterização de isolados de *M. tuberculosis* resistentes à PZA

O *primer* P1-F juntamente com o P1-R amplificam um fragmento de 380 pb referente à porção inicial do gene *pncA*, enquanto P2-F com o P2-R amplificam um fragmento de 350 pb referente à porção final do gene (Figura 6).

As reações de amplificação foram realizadas conforme descrito anteriormente na metodologia. Para se estabelecer as melhores condições de amplificação dos fragmentos que identificam o gene *pncA* ou seja, uma amplificação sem a interferência de fragmentos inespecíficos, foram realizados testes envolvendo alterações na concentração dos *primers*, de MgCl₂ e de DNA, bem como na temperatura de anelamento dos *primers*.

6.3.1- Temperatura de anelamento dos primers

Conforme descrito por Scorpio *et al.* (1997), a temperatura ideal para o anelamento dos *primers* na amplificação do gene *pncA* era 55°C, porém nós observamos que produtos inespecíficos foram gerados nesta condição. Portanto, diferentes temperaturas foram testadas (55°C, 60°C, 65°C, e 68°C). Observou-se que a temperatura ideal de amplificação foi de 68°C, na qual os produtos inespecíficos diminuem consideravelmente, proporcionando uma visualização clara dos fragmentos de interesse (Figura 7).

6.3.2- Concentração de MgCl₂

Outro componente que influencia na amplificação por PCR, é a concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂) presente no tampão de reação. Foram realizados testes com 1,5 mM; 2,5 mM e 3,0 mM de MgCl₂. Após este teste, realizado com temperatura de anelamento a 68°C, observou-se que o uso de tampão com 3,0 mM de MgCl₂, proporcionava um produto de PCR livre de fragmentos inespecíficos.

6.3.3- Determinação da concentração de DNA e de primer

Os testes para determinar a concentração adequada de DNA de *M. tuberculosis* foram feitos com 30 ng, 60 ng, 100 ng, 120 ng, 150 ng e 200 ng de DNA por reação. Os

fragmentos de interesse foram perfeitamente amplificados com 60 ng de DNA na reação. Os *primers* foram adicionados numa concentração de 40 pmol.

A partir destes testes, adotou-se a utilização de 3,0 mM de MgCl₂ no tampão de reação e a temperatura de anelamento dos *primers* como 68°C, 60 ng de DNA e 40 pmol de *primers* (Figura 8).

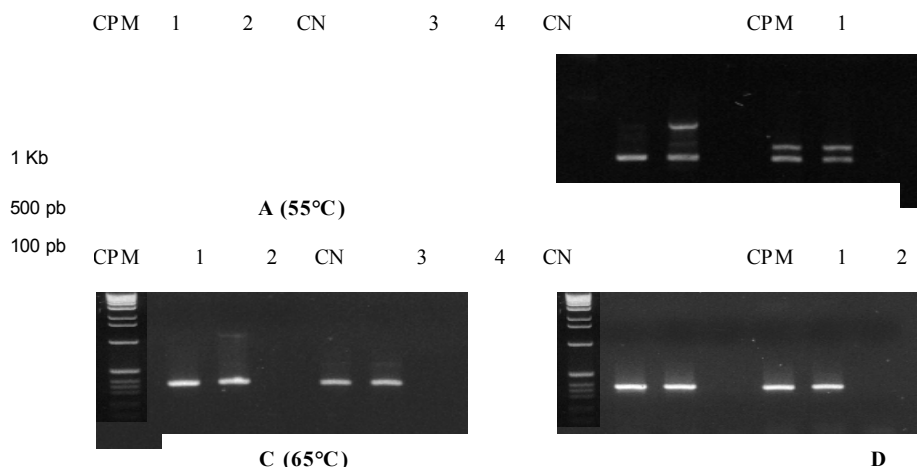


Figura 7- Padronização das condições de reação de PCR: teste com diferentes temperaturas de anelamento dos “primers”. CPM = controle de tamanho molecular 1 kb DNA ladder; linha 1 e 2 = amplificação do

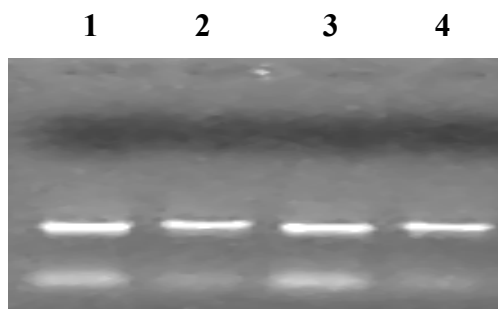


Figura 8- Produtos de PCR gerados a partir de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose 1,5%. Linha 1 e 3 = amplificação do fragmento de 350 pb ; linha 2 e 4 = amplificação do fragmento de 380 pb.

380 pb

350 pb

Inicialmente, ambos os fragmentos foram parcialmente seqüenciados com o "Thermo Sequenase radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit" e comparados com as seqüências correspondentes depositadas no GenBank, confirmando a seqüência do gene.

6.4- Padronização das condições de amplificação por PCR para caracterização de Isolados de *M. tuberculosis* resistentes à EMB

O *primer* E1-F juntamente com o E1-R amplificam um fragmento de 803 pb referente a parte do gene *embB* onde ocorrem mais de 70% das mutações responsáveis pela resistência de *M. tuberculosis* à etambutol.

As reações de amplificação foram realizadas conforme descrito anteriormente na metodologia. Para se estabelecer as melhores condições de amplificação dos fragmentos que identificam o gene *embB* ou seja, uma amplificação sem a interferência de fragmentos inespecíficos, foram realizados testes envolvendo alterações de temperatura de anelamento dos "*primers*", concentração de MgCl₂, de DNA e dos "*primers*".

Conforme descrito por Ramaswamy *et al.*, 2000, inicialmente as reações de amplificação foram realizadas em volumes de 50 µl contendo 50 mM KCl, 10 mM tris-HCl (pH 8,3), 3,0 mM MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleosídeo trifosfato e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Cenbiot/UFRGS), 40 pmoles dos *primers* 100 ng de DNA de *M. tuberculosis*. extraído de cultura

através do método CTAB. A amplificação foi feita a partir de 1 ciclo inicial de 3 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 68°C, 1 min a 72°C e um ciclo final de 5 min a 72°C.

Foram testadas inúmeras condições de temperatura de anelamento para os *primers* (60°C até 68°C), concentração de MgCl₂ (1,5 mM até 3,0 mM), número de ciclos, concentração de *primers* e de DNA além do tipo da Taq (Platinum Taq DNA polimerase). Contudo, em nenhum dos testes houve a amplificação do fragmento esperado.

Sendo assim, testou-se a adição, na PCR, de um reagente (PCRx *Enhancer Solution*, Gibco BRL) usado para facilitar a eficiência de amplificação de seqüências com conteúdo rico em GC. Este reagente aumenta a especificidade dos *primers* e mantém a termoestabilidade da enzima, além de ampliar a temperatura ótima de anelamento e a concentração ótima de MgCl₂.

Primeiramente, um teste de concentrações de *Enhancer Solution* foi realizado (Tabela 6 e Figura 9), mantendo-se as mesmas concentrações de reagentes e condições de amplificação citadas anteriormente.

Tabela 6- Teste de concentrações de *Enhancer Solution*

Componentes da PCR	Concentração de <i>Enhancer Solution</i>				
	0,5X	1X	2X	3X	4X
Volume Final da PCR (μl)	50	50	50	50	50
Volume de água MQ (μl)	35,5	33	28	23	18
Volume de <i>Enhancer solution</i> (μl)	2.5	5	10	15	20

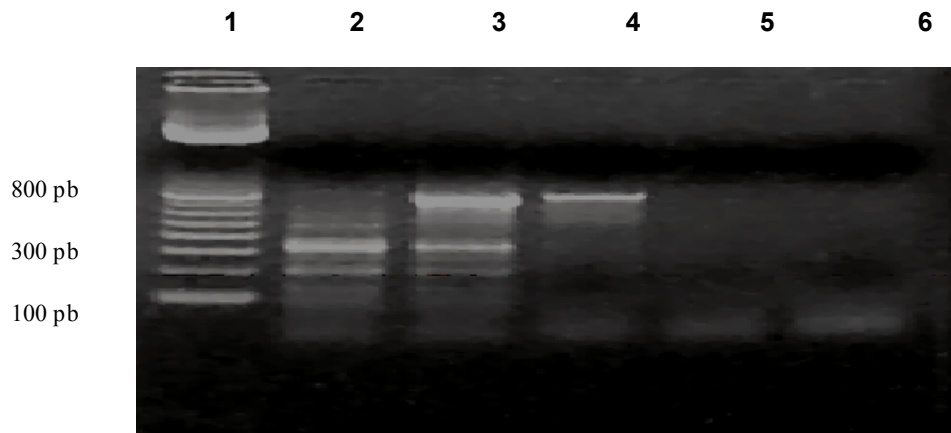


Figura 9- Teste de concentrações de *Enhancer Solution*. Produtos de PCR gerados a partir de DNA de *M. tuberculosis*. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose 1,5%. Linha 1, padrão de tamanho molecular 100 bp DNA Ladder, linhas 2-6, produtos de PCR gerados com diferentes concentrações de enhancer solution (0,5X, 1X, 2X, 3X e 4X, consecutivamente).

A partir deste resultado, os isolados resistentes à etambutol tiveram seu DNA amplificado por PCR contendo 10 μ l (2X) de *Enhancer Solution*. (Figuras 9 e 10)

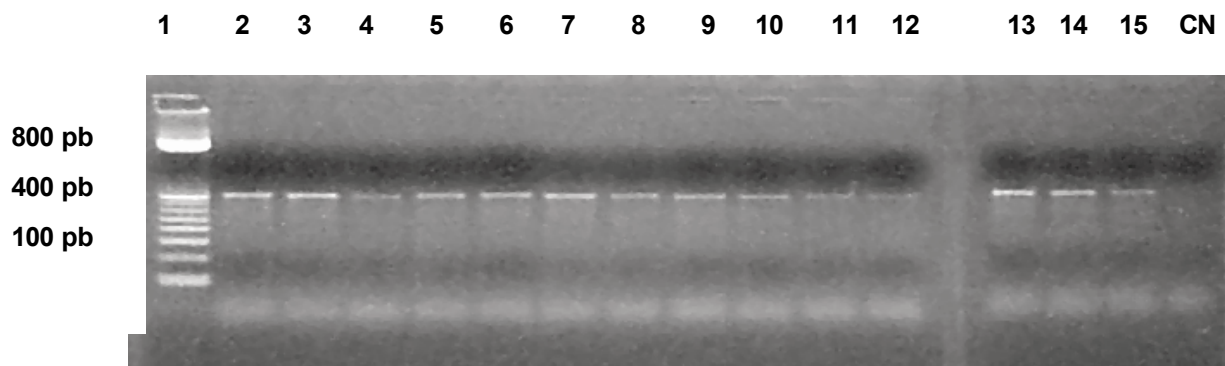


Figura 10- Produtos de PCR gerados a partir de DNA de *M. tuberculosis* extraído de isolados de amostras clínicas de pacientes da rede de saúde pública do RS. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose 1,5%. Linha 1, padrão de tamanho molecular 100 bp DNA Ladder, linhas 2-15, fragmentos de 803 pb, linha CN- controle negativo da reação.

O fragmento foi seqüenciado, parcialmente com o *Thermo Sequenase radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit* e comparado com a seqüência depositada no GenBank (Z80343).

6.5- Análise das seqüências

6.5.1- Isolados resistentes à PZA

Foram analisados por seqüenciamento automático, 59 isolados de *M. tuberculosis* dos quais, pelos testes convencionais, 40 foram considerados PZA- resistentes e 19 PZA-sensíveis. Dos 40 resistentes, 29 apresentaram alterações no gene *pncA* e 11 possuíam *pncA* do tipo selvagem (H37Rv). Nenhum dos isolados sensíveis apresentou mutação em *pncA*.

Todos os 40 isolados apresentavam resistência à outras drogas (perfis variáveis) enquanto 36 (90%) eram multi-droga resistentes (TBMR).

A maioria (18/29) (62,1%) dos mutantes apresentou alterações envolvendo um único nucleotídeo. Dois mutantes apresentaram alteração gerando códon de terminação e dois apresentaram mutação silenciosa. Os códons de terminação ocorreram por substituição de nucleotídeo nas posições 297 e 309 (Tabela 8). Estas alterações, certamente diminuem ou terminem prematuramente a síntese da proteína (Zhang and Mitchison, 2003). A mutação silenciosa ocorreu em 2 isolados, no mesmo códon (138), onde houve a substituição de uma timina por uma citosina na posição 414. Os 14 isolados restantes tiveram substituição de nucleotídeo gerando, conseqüentemente, alteração de aminoácido. Também foram caracterizadas alterações como deleções e inserções que variaram de 1-5 nt. (Tabelas 7 e 8).

As deleções foram observadas em 4 isolados e em um destes, 5 pb foram deletados. Sete isolados foram considerados mutantes por inserção, destes, 2 apresentaram inserção de 2 nucleotídeos, 3 inserção de 5 nucleotídeos e os outros 2 tiveram inserção de um único nucleotídeo (Tabela 7).

Todos estes isolados tiveram atividade de pirazinamidase negativa, confirmando a resistência à PZA.

Outros estudos têm demonstrado que existem locais preferenciais de mutação em *pncA*. Scorpio *et al.* (1997), descreveram 3 regiões: entre os códons 5 -12, 69 -85 e 132 -142. Neste trabalho, a maior parte das mutações em *pncA* ocorreu entre os códons 128 e 171. Lemaitre *et al.* (1999), através do alinhamento destas regiões, confirmaram um alto conteúdo de

resíduos conservados e propuseram a importância estrutural e catalítica destas regiões para a PZase.

Possivelmente estas alterações podem resultar em modificação conformacional do sítio ativo da enzima PZase, e conseqüentemente na diminuição da atividade observada em cepas PZA-resistentes (Zhang and Mitchison, 2003).

A atividade da PZase foi verificada em todos os isolados. Trinta e nove (97,5%) dos 40 PZA-resistentes demonstraram ter PZase inativa, confirmando os testes de sensibilidade e um isolado mostrou Pzase ativa, porém este isolado não apresentou alterações no gene *pncA*. Todos os PZA-sensíveis (19) apresentaram PZase ativa.

Neste trabalho nós identificamos e caracterizamos 12 novas mutações no gene *pncA* de *M. tuberculosis* (Figura 11). Estas alterações foram consideradas novas após uma comparação feita com diversos trabalhos (Scorpio and Zhang, 1996; Sreevatsan *et al.*, 1997; Scorpio *et al.*, 1997; Mestdagh *et al.*, 1999; Marttila *et al.*, 1999; Morlock *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Hannan *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002; Zhang and Mitchison 2003; Huang *et al.*, 2003; Miyagi *et al.*, 2004; Wade *et al.*, 2004; Portugal *et al.*, 2004).

Nós ainda encontramos 3 grupos de 3 isolados e outros 3 grupos de 2 isolados mostrando a mesma mutação (Tabela 7). Estes isolados foram genotipados por *spoligotyping* (Kamerbeek *et al.*, 1997) para verificar clonalidade entre aqueles que possuíam a mesma alteração em *pncA*. Nós identificamos um grupo de 3 e um grupo de 2 isolados que possuíam *spoligotyping* relacionados, ou melhor, possuíam somente um espaçador de diferença entre eles. Posteriormente nós submetemos estes isolados a um *Double-Repetitive-Element* PCR (DRE-PCR) Friedman *et al.* (1995).

Após a realização desta técnica, dois grupos (1 de 3 isolados e outro de 2 isolados) ainda continuaram demonstrando relação, no entanto estes eram provenientes de pacientes de uma mesma cidade, sugerindo transmissão de uma cepa já resistente entre estes pacientes. O restante dos isolados foi discriminado pelo spoligotyping, já que estes possuíam 3 espaçadores de diferença, indicando que eram cepas diferentes, mas adquiriram o mesmo tipo de mutação.

Enquanto mutações no *pncA* vem sendo consideradas responsáveis pelo mecanismo de resistência à PZA, neste trabalho onze isolados considerados PZA-resistentes, pelos testes convencionais, não apresentaram alteração em *pncA*, mas possuíam Pzase negativa.

Resultados semelhantes vêm sendo descritos por (Marttila *et al.*, 1999, Lemaitre *et al.*, 1999, Cheng *et al.*, 2000) que relatam a existência de uma pequena proporção de cepas resistentes que não apresentam alterações neste gene ou sequer na região promotora do mesmo sugerindo outras regiões genômicas envolvidas nos mecanismos de resistência à PZA.

Recentemente 2 alternativas foram propostas: atividade de efluxo de ácido pirazinóico (POA) (Zhang *et al.*, 1999) e a deficiência no metabolismo (aproveitamento) da PZA pelo *M. tuberculosis* (Zhang and Mitchison, 2003).

Muitos trabalhos (Scorpio *et al.*, 1997, Marttila *et al.*, 1999, Park *et al.*, 2001, Suzuki *et al.*, 2002, Portugal *et al.*, 2004) citam a presença de alterações na região regulatória do gene *pncA*. Entretanto, nós não identificamos nenhuma mutação nesta região do gene (Figura 11).

A alta diversidade de mutações ao longo do gene *pncA* (troca de nucleotídeos, deleções, inserções) foi verificada neste trabalho, assim como vem sendo demonstrada em diferentes estudos variando entre (72- 98%) (Inderlied *et al.*, 2003, Zhang and Mitchison, 2003). Esta instabilidade gênica tem sido relatada como característica, quase que exclusiva, de *pncA*, e não

é usualmente encontrada em outros genes envolvidos com resistência à drogas (Zhang and Mitchison, 2003). Ainda não se sabe porque isto acontece, porém há uma hipótese de que por ser o gene *pncA* muito pequeno, a PZase não seria uma enzima essencial para a micobactéria, visto que muitas alterações neste gene são toleradas e cepas resistentes à PZA desprovidas de Pzase continuam sendo fortemente virulentas e capazes de causar transmissão ativa e doença (Cheng *et al.*, 2000).

A maioria dos estudos em relação à resistência à PZA compara as alterações gênicas com os testes convencionais, principalmente com o CMI que normalmente varia de 100 até 900 µg/mL (Scorpio and Zhang, 1996; Srevatsan *et al.*, 1997; Scorpio *et al.*, 1997; Marttila *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003; Miyagi *et al.*, 2004; Portugal *et al.*, 2004) . No entanto, todos utilizam sistemas automatizados para este fim. A partir dos valores de MIC alguns autores têm sugerido uma relação entre as alterações no gene , como as mesmas interferem nas concentrações de PZA que devem ser usadas nos testes de suscetibilidade à droga (Cheng *et al.*, 2000; Zhang and Mitchison 2003, Portugal *et al.*, 2004)

No Brasil, o teste convencional para detectar isolados de *M. tuberculosis* resistentes à PZA, é o descrito por Canetti em 1963, porém os resultados discordantes entre laboratórios são bastante freqüentes, além deste método exigir muito tempo para ser realizado.

A maioria dos laboratórios de referência para TB não costuma realizar este teste, pois as dificuldades na determinação da sensibilidade à PZA existem principalmente pela acidificação requerida do meio, para a ativação da droga (pH= 5,5) (McDermot *et al.*, 1954, Heifets *et al.*, 2002) assim este processo acaba inibindo, na maioria das vezes, o crescimento do *M. tuberculosis*, conseqüentemente os resultados não são confiáveis.

O ideal seria o uso de sistemas automatizados como o BACTEC MGIT 460, porém estes equipamentos são extremamente onerosos e exigem treinamento específico. Atualmente, uma alternativa para a detecção de resistência à PZA pode ser o seqüenciamento automático, que vem sendo considerado auxiliar para a caracterização das mutações que estejam ocorrendo no gene *pncA*, e também como colaborador para o aprimoramento de outros métodos genotípicos de detecção da resistência à PZA, tais como o SSCP e o PCR-RFLP.

Neste estudo nós descrevemos a alta diversidade do gene *pncA* de isolados de *M. tuberculosis* resistentes à PZA. Nós também encontramos cepas que não possuíam alterações neste gene, mas demonstravam inatividade da enzima Pzase, sugerindo a participação de outras regiões do genoma na resistência à PZA. Além disto, nosso estudo revelou 12 novas alterações que podem ocorrer em *pncA* e podem ser responsáveis pela resistência dos isolados analisados.

Tabela 7- Alterações encontradas no gene *pncA* de *M. tuberculosis* isolados no Brasil resistentes à PZA do Brasil

No de Isolados (29)	Trocas em		
	Nucleotídeos (no.)	Codons (no.) ^A	Aminoácido
1	G>C no (07)	GCG > CCG (03)	Ala > Pro
2 ^c	inserção de GC no (76)	frameshift <i>b</i>	NA
1	deleção de 5 bp no (74)	frameshift <i>b</i>	NA
1	deleção de G no (136)	frameshift <i>b</i>	NA
1	C>A no (151)	CAC > AAC (51) <i>b</i>	His > Asn
3	inserção de 5 bp no (182)	frameshift <i>b</i>	NA

1	T>C no (202)	TGG > CGG (68) <i>b</i>	Trp > Arg
1	deleção de T no (213)	frameshift <i>b</i>	NA
1	A>C no 226	ACT > CCT (76)	Thr > Pro
1	A>G no 245	CAT> CGT (82)	His > Arg
1	A>T no 246	CAT> CTT (82) <i>b</i>	His >Leu
1	C>G no 297	TAC > TAG (99)	Tyr > stop
1	C>G no 309	TAC > TAG (103)	Tyr > stop
2	inserção de G no 315	frameshift <i>b</i>	NA
1	T>G no 386	GTC > GGC (128)	Val > Gly
2	T>C no 414	TGT > TGC (138)	Cys > Cys
1	deleção de C no 422	frameshift <i>b</i>	NA
3 <i>c</i>	T>G no 464	GTG > GGG (155)	Val > Gly
1	G>A no 485	GGT > GAT (162) <i>b</i>	Gly > Asp
3	C>A no 512	GCG > GAG (171) <i>b</i>	Ala > Glu

a Número da posição do codon foi contado a partir do start codon (ATG) do gene *pncA*.

b Indica as mutações novas, não publicadas em estudos anteriores.

c Grupos de isolados que mostraram spoligotypes relacionados e perfil idêntico em DRE-PCR.

NA nao aplicada

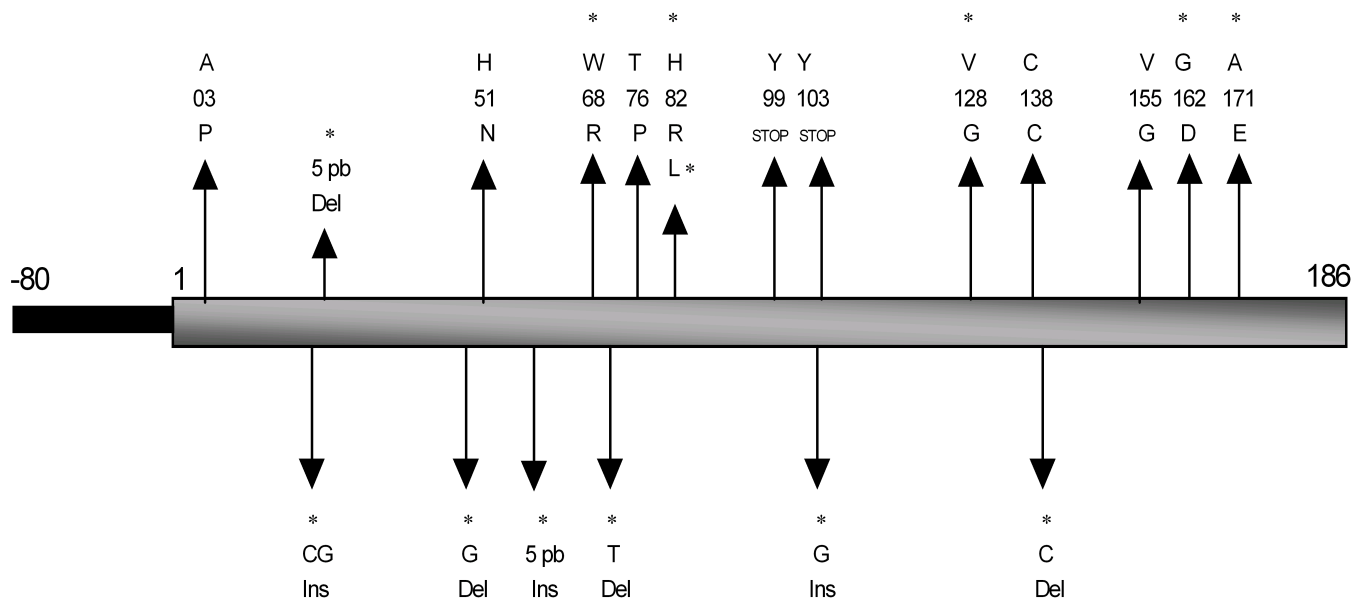


Figura 11- Representação esquemática das alterações encontradas no gene *pncA* de *M. tuberculosis* encontradas neste trabalho. Os asteriscos (*) indicam as mutações novas, não descritas anteriormente. Ins = inserção, Del= deleção.

Tabela 8- Percentuais das alterações encontradas nos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à PZA.

Tipo de mutação	Frequência (%)	Tamanho da mutação
Substituição de nucleotídeo	18/29 (62.1%)	1 pb
Stop codon	2/18	1 pb
Mutação silenciosa	2/18	1 pb
Substituição de aminoácido	14/18	1 pb
Deleção de nucleotídeo*	4/29 (13,8%)	1-5 pb
Inserção de nucleotídeo*	7/29 (24.1%)	1-5 pb

*Mutações que causam frameshift, possivelmente resultando em outro polipeptídeo ou em um polipeptídeo truncado.

6.5.2- Isolados resistentes à EMB

Etambutol vem sendo usado no tratamento da TB desde 1960 (Forbes *et al.*, 1962). Várias hipóteses vêm sendo criadas para explicar o mecanismo de ação do EMB. A maioria dos estudos aponta a alteração tridimensional da estrutura da parede celular micobacteriana, no entanto efeitos pleiotrópicos têm sido descritos (Beggs and Andrews, 1973, Cheema *et al.*, 1985, Silve *et al.*, 1993, Ramaswamy *et al.*, 2000).

Neste trabalho foram analisados DNAs de isolados de *M. tuberculosis* por seqüenciamento automático, buscando a caracterização de um fragmento do gene *embB*, visto que a maioria dos isolados EMB-resistentes pode ser identificada por análise deste gene, principalmente do códon 306. Ramaswamy *et al* (2000) analisaram seqüências de 12 genes que poderiam estar envolvidos com a resistência à EMB e encontraram mutações no gene *embB* em 68% dos isolados, no entanto o restante dos isolados possuía mutação em um dos demais 11 genes analisados, indicando os múltiplos mecanismos moleculares envolvidos no fenótipo EMB-resistente.

Evidências bioquímicas têm colocado as arabinosiltransferases, produto do operon *embCAB*, como alvo do EMB e este conceito vem sendo suportado por dados obtidos através de estudos com *M. avium*, *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* (Alcaide *et al.*, 1997, Belanger *et al.*, 1996). Telenti *et al.*, (1997), demonstraram que mutações ao longo do operon *embCAB* de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* estavam associadas com a resistência ao EMB. Sreevatsan *et al.*, (1997) confirmaram que certas mutações neste operon estavam exclusivamente associadas com *M tuberculosis* EMB-resistente.

Apesar destas descobertas, a análise do operon *embCAB* torna-se difícil devido ao tamanho (10 kb), no entanto alguns grupos fizeram estudos complexos e caracterizaram esta região (Ramaswamy and Musser, 1998, Sreevatsan *et al.*, 1997). Informações deste tipo são muito importantes para o desenvolvimento de métodos moleculares rápidos para a identificação dos isolados de *M. tuberculosis* EMB-resistentes (Ramaswamy *et al.*, 2000).

Nós analisamos o DNA de 58 isolados de *M. tuberculosis* por seqüenciamento automático, dos quais, pelos testes convencionais, 39 foram considerados EMB-resistentes e 19 EMB-sensíveis. Dos 39 resistentes, 23 apresentaram alterações no fragmento de *embB* analisado e 16 possuíam o fragmento com padrão *embB* wild-type (H37Rv). Três dos 19 isolados sensíveis apresentaram mutação em *embB*.

6.5.2.1- Análise das seqüências

Dos 39 isolados de *M. tuberculosis*, classificados pelos métodos convencionais como EMB-resistentes, 23 (59%) foram caracterizados como mutantes após a análise do seqüenciamento automático (Tabela 9). Todos estes isolados possuíam mutação no códon 306 (Met) do gene *embB*. Estas alterações mantêm o perfil que vem sendo descrito na literatura, ou seja, o códon 306 caracterizado como uma Metionina (Met) se altera por uma simples substituição de nucleotídeo e pode dar origem a uma Isoleucina (Ile), uma Valina (Val) ou até mesmo uma Leucina (Leu) (Figura 12).

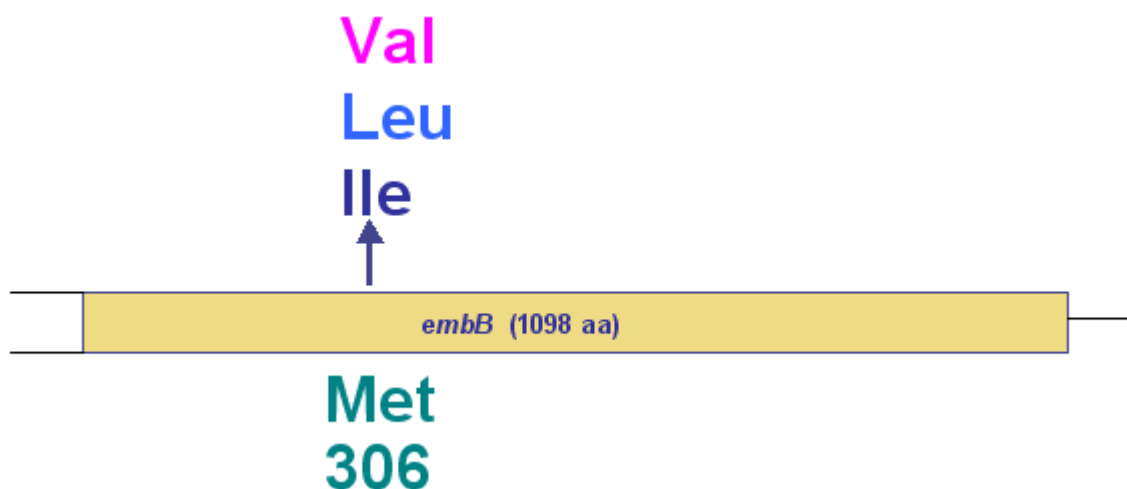


Figura12- Representação esquemática das alterações encontradas no fragmento do gene *embB* de *M. tuberculosis* encontradas neste trabalho.

Dos 23 isolados mutados, nós caracterizamos 11 nos quais houve troca de ATG (Met) > ATA (Ile), 09 com troca de ATG (Met) > GTG (Val) e apenas 03 com troca de ATG (Met) >ATC (Leu) (Tabela 9).

Quanto à presença de mais de uma mutação, por isolado, esse estudo não obteve isolados com este perfil, bem como a presença de mutações silenciosas não foi verificada.

As mutações na região considerada *hotspot* do gene *embB* (códon Met306), ocorreram em 59% das cepas resistentes. Estes dados concordam com outros estudos, publicados em diferentes áreas do mundo, que relatam freqüências de mutação no Met306 do gene *embB*, que

variam de 48% (Mokrousov *et al.*, 2002) até mesmo de 89% (Sreevatsan *et al.*, 1997) em cepas resistentes.

Tabela 9- Alterações encontradas nos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à Etambutol

NÚMERO DOS ISOLADOS	%	CÓDON	ALTERAÇÃO
RS-7180, RS-0489, RS-3565-sp, SP-5733, SP-6151, SP-6411, SP-7288, SP-6971, SP-10894, SP-10866, SP-10968, SP-9053, SP-9183	48	306	ATG (Met) > ATA (Ile)
RS-8052-sp, RS-0021-sp, RS-2802, SP-5687, SP-6376, SP-6620, SP-7138, SP-7212, SP-10591	39	306	ATG (Met) > GTG (Val)
RS-0561, RS-3338, SP-7096, SP-9005	13	306	ATG (Met) > ATC (Leu)

RS-* isolados provenientes do Rio Grande do Sul; SP-* isolados provenientes de São Paulo; Met = metionina; Ile = Isoleucina; Val = valina; Leu = leucina. Em azul: isolados caracterizados pelos testes convencionais como sensíveis à EMB, mas que possuíam alteração no códon 306 de *embB*.

Em relação aos 19 isolados caracterizados, pelos métodos convencionais, como sensíveis à EMB, nós observamos que 16 (84%) não apresentaram alterações no fragmento do gene analisado e 03 (16%) tinham o códon 306 mutado, sendo dois Met306Ile e um para Met306Leu (Tabela 9). As discordâncias entre resultados de testes fenotípicos e genotípicos vem sendo relatada (Mokrousov *et al.*, 2002, Tracevska *et al.*, 2004). Resultados similares aos encontrados neste estudo foram demonstrados por Mokrousov *et al.* em 2002, na Rússia, onde mutações no códon 306 foram encontradas em 48% dos isolados resistentes analisados e em

31% dos sensíveis (Mokrousov *et al.*, 2002). Tracevska *et al.* (2004) encontraram uma taxa de 18%, dos 33 isolados sensíveis à EMB analisados, com alteração no gene *embB*.

6.5.2.2- Comparação entre os testes realizados

Após a análise dos resultados obtidos por seqüenciamento automático, uma análise comparativa foi realizada entre os resultados obtidos pelos métodos convencionais, o seqüenciamento automático e o CMI de cada isolado. De uma maneira geral, 33 isolados (57%) tiveram resultados iguais nos 3 tipos de teste (Tabela 11) e 25 (43%) apresentaram algum tipo de discordância entre os testes (Tabela 10).

Observou-se que dos 58 isolados analisados (39 resistentes e 19 sensíveis), 23 (59%) dos resistentes apresentaram mutação no fragmento do gene *embB* analisado, sendo que 06 tiveram CMI < 1 µg/mL e 07 ≥ 1 µg/mL, no entanto 16 (41%) não apresentaram alteração. Dentre estes 16 isolados, 07 tiveram CMI ≥ 1 µg/mL e os outros 09 apresentaram CMI < 1 µg/mL. Em relação aos isolados caracterizados fenotipicamente como sensíveis, 03 (16%) apresentaram mutação em *embB* e 16 (84%) tinham o fragmento padrão de H37Rv, todos apresentaram CMI < 1 µg/mL. Estes resultados podem ser melhor visualizados na Figura 13 e na Tabela 10.

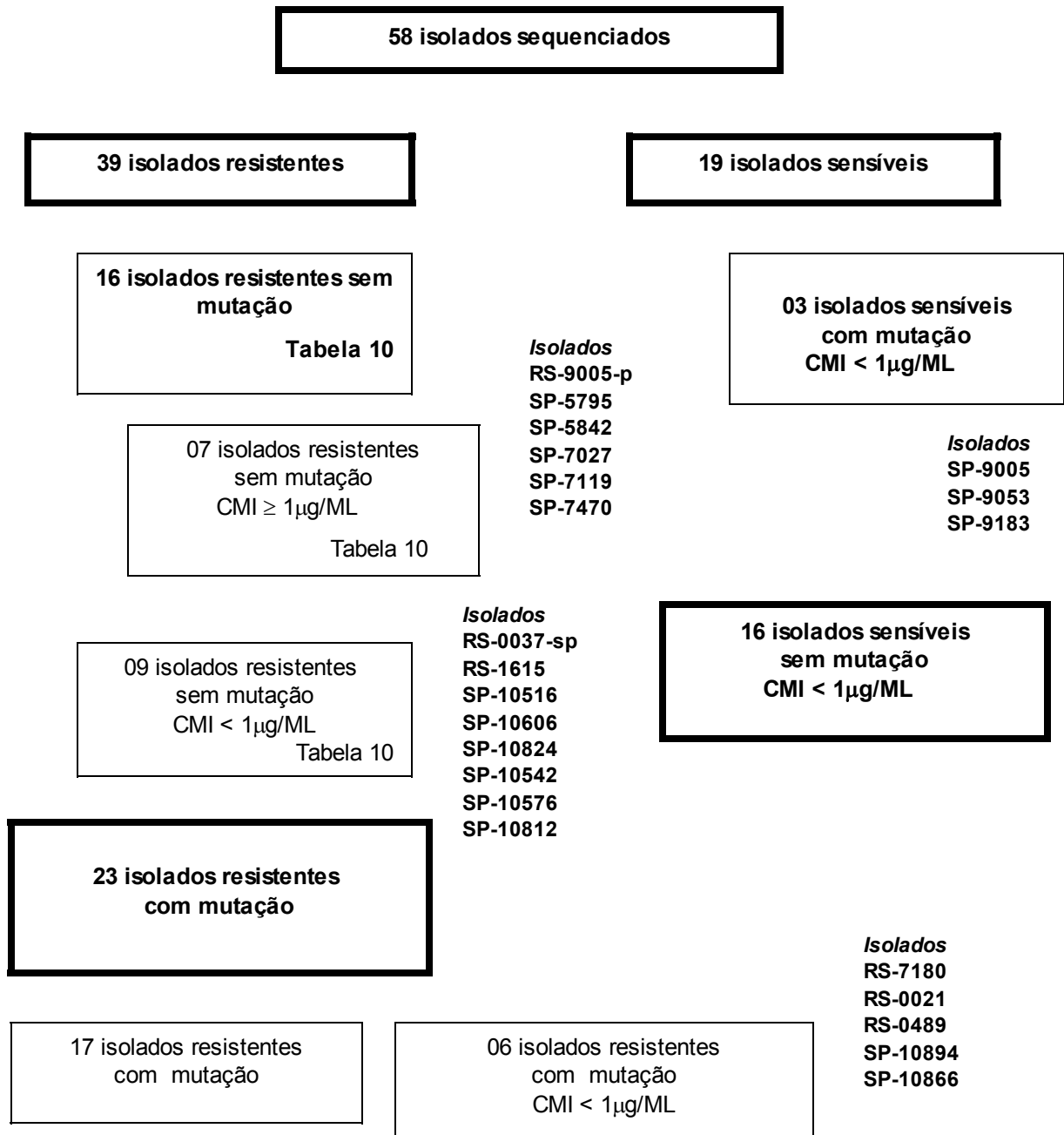


Figura 13. Esquema da distribuição dos isolados de *M. tuberculosis* de acordo com os resultados de seqüenciamento, perfil de susceptibilidade pelos métodos convencionais e CMI.

Tabela 10. Perfil dos isolados de *M. tuberculosis* que apresentaram discordância entre os métodos estudados (Testes Convencionais, CMI e Sequenciamento), para EMB

Isolados	TC	CMI $\mu\text{g/mL}$	Mutação <i>embB</i>
RS-9005-p	Resistente	> 16	Não encontrada
SP-5795	Resistente	64	Não encontrada
SP-5742	Resistente	32	Não encontrada
SP-7027	Resistente	16	Não encontrada
SP-7119	Resistente	32	Não encontrada
SP-7470	Resistente	16	Não encontrada
SP-10765	Resistente	1	Não encontrada
SP-9005	Sensível	< 1	ATG (Met) > ATC (Leu)
SP-9053	Sensível	< 1	ATG (Met) > ATA (Ile)
SP-9183	Sensível	< 1	ATG (Met) > ATA (Ile)
RS-7180	Resistente	0,5	ATG (Met) > ATA (Ile)
RS-0021	Resistente	< 0,5	ATG(Met)>GTG(Val)
RS-0489	Resistente	<0,25	ATG (Met) > ATA (Ile)
SP-10894	Resistente	0,25	ATG (Met) > ATA (Ile)
SP-10866	Resistente	0,25	ATG (Met) > ATA (Ile)
SP-10968	Resistente	0,5	ATG (Met) > ATA (Ile)
RS-0037-sp	Resistente	< 0,25	Não encontrada
RS-1615	Resistente	0,5	Não encontrada
SP-10516	Resistente	0,25	Não encontrada
SP-10606	Resistente	0,25	Não encontrada
SP-10824	Resistente	< 0,25	Não encontrada
SP-10542	Resistente	< 0,25	Não encontrada

SP-10576	Resistente	< 0,25	Não encontrada
SP-10812	Resistente	0,25	Não encontrada
SP-10974	Resistente	< 0,25	Não encontrada
TOTAL = 25			

RS- isolado proveniente do Rio G. do Sul, SP- isolado proveniente de São Paulo.

Tabela 11- Distribuição dos isolados de *M. tuberculosis* analisados por seqüenciamento e sua relação com os valores de CMI

Nº de isolados	CMI µg/mL	mutação
resistentes		
1	1	ATG(Met)>GTG(Val)
1	4	ATG (Met) > ATC (Leu)
3	8	ATG (Met) > ATA (Ile)
1	8	ATG (Met) > ATC (Leu)
2	8	ATG(Met)>GTG(Val)
1	16	ATG (Met) > ATC (Leu)
1	16	ATG (Met) > ATA (Ile)
2	32	ATG(Met)>GTG(Val)
2	32	ATG (Met) > ATA (Ile)
3	64	ATG(Met)>GTG(Val)
Total =17		
sensíveis		
16	<1	Sem mutação
Total =16		

A Tabela 11 demonstra que dentre os 33 isolados que tiveram resultados iguais entre os 3 testes, 17 eram resistentes e apresentaram valores de CMI variáveis, não tendo nenhuma relação com o tipo de mutação existente no códon 306 de *embB*.

Os resultados discutidos a seguir podem ser visualizados na Figura 13 e na Tabela 10. Nesse estudo encontramos 16 isolados (41%), com fenótipo resistente, e que não apresentam mutações, sendo sete isolados com CMI $\geq 1 \mu\text{g/mL}$. Para estes isolados, provavelmente, as mutações que lhes conferem resistência estejam fora da região estudada. Esta hipótese já foi levantada por outros estudos, que citam mutações em códons localizados fora da região *hotspot* do gene *embB*, como os códons 497 (Lee *et al.*, 2004), 745, 959, 1024 (Ramaswamy *et al.*, 2000), os quais não foram avaliados por este estudo. Há a possibilidade de que outras regiões do operon *embCAB* possam apresentar mutações, alterando a conformação da arabinosiltransferase (Ramaswamy *et al.*, 2000). Outra hipótese é a ocorrência de outros tipos de mecanismo de resistência para esses isolados, assim como ocorre em isolados resistentes à rifampicina onde produtos produzidos por mutações em outros genes possam participar da permeabilidade do fármaco (Kapur *et al.*, 1994; Musser, 1995). Podemos também sugerir a possibilidade de alterações no mecanismo de efluxo do EMB, o que levaria a micobactéria a resistir ao tratamento e não apresentar nenhum tipo de alteração na região caracterizada.

Encontramos seis isolados considerados resistentes fenotipicamente, cujas CMIs foram $< 1,0 \mu\text{g/mL}$, mas que apresentaram mutações. Os isolados (RS-7180, RS-0489, SP-10894, SP-10866, SP-10968) tiveram a mutação Met(306)Ile, enquanto o isolado (RS-0021) apresentou a mutação Met(306)Val. Segundo Ribeiro (2004), podemos considerar uma possibilidade de problemas na determinação da CMI, provavelmente no ajuste do inóculo, que é a principal causa de erros destas metodologias, já que as CMIs obtidas foram próximas do ponto de corte considerado.

Para os isolados caracterizados fenotipicamente como sensíveis, que apresentaram mutação (SP-9005 Met(306)Leu, SP-9053 e SP-9183 Met(306)Ile) e que possuíam CMI < 1 µg/mL, talvez a explicação seja a de que a quantidade de bacilos mutantes não tenha sido suficiente para ser detectada pelos testes fenotípicos, pois os tipos de mutações apresentados geralmente produzem altos níveis de resistência.

Nesse estudo, quando avaliamos as CMIs, consideramos o teste feito manualmente, enquanto a maioria dos autores publica seus resultados a partir do uso de métodos automatizados. Acreditamos que os métodos automatizados tragam uma maior confiabilidade aos resultados, proporcionando uma avaliação mais efetiva dos resultados.

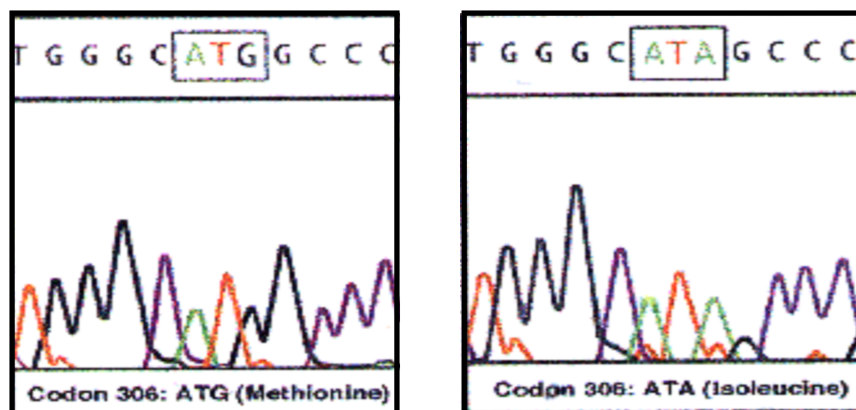


Figura 14- Comparação entre eletroferogramas obtidos após seqüenciamento de *M. tuberculosis* (H37Rv) e uma cepa resistente à EMB, mostrando a troca da Met 306 por Ile.

7- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram conhecer melhor as alterações genotípicas que podem estar relacionadas ao mecanismo de resistência em isolados de *M. tuberculosis* resistentes à PZA e/ou EMB. Nossos achados em relação aos isolados resistentes à PZA demonstraram que mutações podem ocorrer aleatoriamente ao longo de todo o gene *pncA* e que nos isolados estudados puderam ser caracterizadas novas alterações, não descritas anteriormente, que possivelmente estejam relacionadas com a resistência de *M. tuberculosis* à esta droga.

Os isolados de *M. tuberculosis* estudados em relação à resistência à EMB, originaram resultados semelhantes aos encontrados na literatura, porém nenhuma alteração nova foi encontrada no fragmento do gene *embB*. Estes dados puderam ser comparados com outras técnicas que caracterizam, fenotipicamente, cepas resistentes, no entanto muitos isolados apresentaram discordância de resultados entre o método genotípico (seqüenciamento automático) e os fenotípicos. De uma maneira geral, o seqüenciamento dos genes supostamente envolvidos com a resistência de isolados de *M. tuberculosis* às drogas utilizadas no tratamento da TB pode ser uma alternativa rápida para a determinação do perfil de resistência em laboratórios de rotina que possuam infra-estrutura básica para cultivo de *M. tuberculosis*.

A partir dos resultados deste trabalho, esse estudo colaborou para caracterizar novas alterações que podem estar envolvidas com a resistência de *M. tuberculosis* à PZA

e/ou EMB através de seqüenciamento automático, e desta forma pode auxiliar no diagnóstico de resistência micobacteriana, bem como na elaboração de kits de diagnóstico que sejam baseados em sondas específicas.

A continuação dessa linha de pesquisa é necessária para avaliar se as novas alterações encontradas em *pncA* são realmente responsáveis pela resistência do isolado à PZA e principalmente o que acontece com os isolados que não apresentam atividade de PZase, mas não possuem alteração ao longo do gene *pncA*.

Um número maior de isolados deve ser avaliado para confirmar se a metodologia, em condições de rotina, possui vantagens em termos de rapidez na obtenção dos resultados e avaliar o custo que isso acrescenta aos laboratórios de saúde pública.

O monitoramento das alterações que ocorrem nos isolado de *M. tuberculosis* resistentes, que circulam no nosso meio, é de grande importância para um laboratório que segue uma linha de pesquisa em resistência micobacteriana, pois permite avaliar novos alvos dos fármacos, conseqüentemente auxiliando para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e no controle da TB.

8- BIBLIOGRAFIA

Alcaide, F.; Pfyffer, G. E.; Telenti, A. The role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2270-2273, 1997.

Aranaz, A.; Lienana, E.; Gomez-Mampaso, E.; Galan, J. C.; Cousin, D.; Ortega, A., Blaquez, J.; Blaquez, F.; Mateos, A.; Suarez, G., and Dominguez, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol*, 3:1263-73, 1999.

Bardarov Jr, S.; Dou, H.; Eisenach, K.; Banaiee, N.; Ya, S.; Chan, J.; Jacobs Jr, W.R., Riska, P.F. Detection and drug-susceptibility testing of *M. tuberculosis* from sputum samples using luciferase reporter phage: comparison with the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system. *Diag Microbiol Infect Dis*, 45:53-61, 2003.

Barreto, A. M. W.; Araujo, J. B. M.; Medeiros, R. F.; and Caldas, P. C. S. Directly sensitivity test of the MB/BacT System. *Mem Inst O Cruz*, 97(2):263-264, 2002.

Bates, J. H. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. *Clin Chest Med*, 1:167-174, 1980.

Beggs, W. I., and Andrews F. A. Nonspecific ionic inhibition of ethambutol binding by *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4:115-119, 1973.

Belanger, A. E.; Besra, G. S.; Ford, M. E.; Mikusova, K.; Belisle, J. T.; Brennan, P. J.; and Inamine, J. M. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11919-11924, 1996.

Bergman J. S. and Woods G. L., Evaluation of the ESP culture system II for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to four primary antituberculous drugs. *J. Clin. Microbiol.* 36:2940-2943, 1998.

Blanchard, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* *Annu. Ver. Biochem.* 65: 215-239, 1996.

Brasil. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Pneumologia Sanitária. Manual de normas para o controle da tuberculose. 4. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995.

Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. I Consenso Brasileiro de Tuberculose. *J Pneumol*, 23(6):294-301, 1997.

Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. I Consenso Brasileiro de Tuberculose. *J Pneumol*, 23(6):294-301, 1997.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª Edição. Rio de Janeiro, FUNASA/CRPHF/SNPT, 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª Edição. Rio de Janeiro, FUNASA/CRPHF/SNPT, 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica. Tuberculose. Dados e indicadores. Epidemiologia da TB no Brasil. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/saude>>. Acesso em: 23 abr 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica. Tuberculose. Dados e indicadores. Epidemiologia da TB no Brasil. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/saude>>. Acesso em: 23 abr 2004.

Brennan, P.J., and Nikaido, H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, 64:29-63, 1995.

Brown T. J., Tensel, O., and French, G. L. 2000. Simultaneous identification and typing of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by analysis of *pncA* and *rpoB*. *J Med Microbiol* 49:651-656

Butler, W. R. and Kilburn, J. O.; Suceptibility of *Myconacterium tuberculosis* to pyrazinamide and its relationship to pyrazinamidase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 600-601, 1983.

Cafrune, P. I. 2003. Epidemiologia Molecular da Tuberculose no Interior do Rio Grande do Sul. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Biologia Molecular e Celular.

Campos H. S. *Mycobacterium tuberculosis* resistente. De onde vem a resistência? *Boletim de pneumologia sanitária*.vol.7. 51-64. 1999.

Canetti, G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, 92(5):687-703, 1965.

Canetti, G.; Rist, N.; Grosset, J.; Mésure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibaïcillares par la méthode des proportins. *Ver. Tuberc. Pneumol.* 27: 217, 1963.

Caviedes, L.; Lee, T. S.; Gilman, R. H.; Scheen, P.; Spellman, E.; Lee, H.; Berg, D. E.; Montenegro-James, S. M.; and The Tuberculosis Working Group in Peru. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. *J Clin Microbiol*, 38(3):1203-120, 2000.

Chan, J. and Kaufmann, S.H.E. Immune mechanisms of protection (chapter 24). In: Bloom, B. R. (Ed.). *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington. ASM Press, 1994

Cheema, S. Astora, S. and Kuller, k. Ethambutol induced leakage of phospholipids in *Mycobacterium smegmatis* *Int Res Commun Syst Med Sci.* 13. 843-844. 1985.

Cheng, S. J., L. Thibert, T. Sanchez, L. Heifets and Y. Zhang. *PncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. . *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:528-532, 2000.

Chopra, I. and Brennan, P. Molecular action of antimycobacterial agents. *Tuberc Lung Dis*, 78:89-98, 1998.

Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E.III., Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., Mclean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream, M-A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J.,

Squares S., Squares R., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S. and Barrell, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393: 537-544, 1998.

Coll, P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 699-308. 2003.

Collins CH, Grange JM, Yates MD. *Tuberculosis Bacteriology, Organization and Practice*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997.

Cooksey, R. C.; Morlock, G. P.; Glickmans, S. and Crawford, J. T. Evaluation of line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York city. *J. Clin. Microbiol.*, 35:1281-1283, 1997.

Cornfield, D. B.; Beavis, K. G.; Greene, J. A.; Bojak, M.; and Bondi, J. Mycobacterial growth and bacterial contamination in the Mycobacteria Growth Indicator Tube and BACTEC 460 culture

Deng, L.; Mykusov, K.; Robuck, G. K.; Scherman, M.; Brennan, P. J.; Mcneil, M. R.; Recognition of multiple effects of ethambutol on metabolism of mycobacterial cell envelope. *Antimicrob. Agents Chemother*. 39: 694-701, 1995.

Dye, C.; Schelle, S.; Dolin, P.; Pathana, V.; Raviglione, M.C., for the WHO Global Surveillance and Monitoring Project. Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA*, 282(7):677-686, 1999.

Espinal, M.A.; Laserson, K.; Camacho, M.; Fuscheng, Z.; Kim, S.J.; Tlali, E.; Smith, I.; Suarez, P.; Antunes, M.L.; George, A.G.; Martin-Casabona, N.; Simelane, P.; Weyer, K.; Binkin, N., and Raviglione, M.C. Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries. *Int J Tuberc Lung Dis*, 5(10):887-893, 2001.

Finken, M. Kirschner, P. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a function 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* 9. 1239-1246. 1993.

Forbes, M. Kuck, N. A. and Petts, E. A. Mode of action of ethambutol. *J. Bacteriol*. 84. 1099-1103. 1962.

Freixo, M.I.; Caldas, P.C.S.; Martins, F.; Brito, R.C.; Ferreira, R.M.C.; Fonseca, L.S., and Saad, M.H.F. Evaluation of E-test strips for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 40(6):2282-2284, 2002.

Freixo, M.I.; Caldas, P.C.S.; Martins, F.; Brito, R.C.; Ferreira, R.M.C.; Fonseca, L.S., and Saad, M.H.F. Evaluation of E-test strips for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 40(6):2282-2284, 2002.

Friedman, C. R., M. Y. Stoeckle, W. D. Johnson Jr., and L. W. Riley. 1995. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *M. tuberculosis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol*. 33: 1383-1384.

Gali, N.; Dominguez, J.; Blanco, S.; Prat, C.; Quesada, M.D.; Matas, L., and Ausina V. Utility of an in-house mycobacteriophage-based assay for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 41(6):2647-2649, 2003.

Gillespie, S.H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(2):267-274, 2002.

Gingeras, T. R.; Ghandour, G.; Wang, E.; Berno, A.; Small, P. M.; Drobniowski, F.; Alland, D.; Desmond, E.; Holodny, M.; and Drenkow, J. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Research*, 8(5):435-448, 1998.

Hazbón, M.H.; Orozco, M.S.; Labrada, L.A.; Tovar, R.; Weigle, K.A., and Wanger, A. Evaluation of E-test for susceptibility testing of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 38(12):4599-4603, 2000.

Heifets, L. and Lindholm-Levy. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semi-dormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. *Am. Ver. Respir. Dis.* 145: 1223-1225, 1992.

Heifets, L.; Linder, T.; Sanchez, T.; Spemcer, D., and Brennan, J. Two liquid medium systems, Mycobacterium Growth Indicator Tube and MB Redox Tube, for *Mycobacterium tuberculosis* isolation from sputum specimens. *J Clin Microbiol*, 38(3):1227-1230, 2000.

Heifets, L.; Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Med. Microbiol.* 51: 11-12. 2002.

Hwang, H.Y.; Chang, C.Y.; Chang, L.L.; Chang, S.F.; Chang, Y.H., and Chen, Y.J. Characterization of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *J Med Microbiol*, 52:239-245, 2003.

Inderlied, C. B. and Pfyffer, G. E. Susceptibility test Methods: Mycobacteria, p. 1149-1177 In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Michael and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Iseman, M.D. Evolution of drug-resistant tuberculosis: a tale of two species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:2428-2429, 1994.

Iseman, M.D.; Cohn, D.L., and Sbardaro, J.A. Directly observed treatment of tuberculosis. *N Engl J Méd*, 328:576-578, 1993.

IUATLD (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease). *Management of Tuberculosis. A Guide for Low Income Countries*. Paris, France. 5th Edition, 2000.

Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. D. A. van Embden. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35:907-914. 36

Kapur, V.; Li, L.L.; Iordanescu, S.; Hamrich, M.R.; Wanger, A.; Kreiswirth, B.N.; and Musser, J.M. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase β subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol*, 32(4):1095-1098, 1994.

Kaufmann, S.H.E., and Van Embden, J.D.A. Tuberculosis: a neglected disease strikes back. *Trends Microbiol*, 1(1):2-5, 1993.

Kenneth S. McKeegan, M. Ines Borges-Walmsley and Adrian R. Walmsley. Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends in Microbiology* Vol. 10 No. 10, 2002.

Khoo, K. H.; Douglas, E.; Azadi, P.; Inamine, J. M.; Besra, G. S.; Mikusova, K.; Brennan, P. J.; Chatterjee, D. Truncated structural variants of lipoarabinomannan in ethambutol drug-resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. Inhibition of arabinan biosynthesis by ethambutol. *J. Biol. Chem.* 271: 28682-28690, 1996.

- Kivi, M. L.; Xuemin, S.; Raychaudhuri, R.; Altman, B.; and Small, P. M. Determining the genomic locations of repetitive DNA sequence with a whole-genome microarray IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 40(6):2192-2198, 2002.
- Konno, K.; Feldman, F. M. and Mcdermot, W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. American Review of Respiratory Diseases. 95: 461-467. 1967
- Konno, K.; Nagayama, H. and Oka, S. Nicotinamidase in mycobacteria: um method for distinguishing bovine type tubercle bacilli from other mycobacteria. Nature. 184: 1743-1744, 1959.
- Koskela, A.K., and Katila, M.L. Susceptibility testing with the manual Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis. J Clin Microbiol, 41(3):1235-1239, 2003.
- Kritski, A. L.; Conde, M. B.; Sousa, G. R. M. Tuberculose do Ambulatório à Enfermaria 2ª edição, 2000.
- Lazlo A.; Rahman, M.; Raviglione, M.C., and Bustreo, F. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Laboratory Network: first round of proficiency testing. Int J Tuberc Lung Dis, 1:231-238, 1997.
- Lee, K. W., Lee, J. M., and Jung, K. 2001. Characterization of *pncA* Mutations of Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. J. Korean Med Sci 16:537-543
- Lee, R. E.; Mikusova, K.; Brennan, P.J.; and Besra, G.S. J. Am. Chem. Soc 117, 11829-11832, 1995.
- Lemaitre, N.; Sougakoff, W.; Truffot-Pernot, C.; Jarlier, V. Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase *pncA*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1761-1763, 1999.
- Marttila, H. J.; Marjamaki, M.; Vyshnevskaya, E.; Vyshnevskiy, B. I.; Otten, T.F.; Vasilyef, A.V.; Viljanen, M. K. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1764-1766, 1999.
- McClatchy, J. K.; TSANG, A. Y. and CERNISH, M. S.; Use of pyrazinamidase activity in *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility. Antimicrob. Agents Chemother. 20: 556-557, 1981.
- McDermott, W. Tompsett, R. Activate of pyrazinamide and nicotinamide in acid environment in vitro. Am Rev Tuberc. 70. 748-754. 1954.
- McNemey R, Wilson SM, Sidhu AM, Harley VS, al Suwaidi Z, Nye PM, Parish T, Stoker NG. Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as a tool for the detection of viable *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. Res Microbiol, 149(7):487-95, 1998.
- Mejia, G. I.; Castrillon, L.; Trujillo, H.; Robledo, J. A. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Int J Tuber Lung Dis, 3(2):138-42, 1999.
- Mestdagh, M.; Fonteyne, P. A.; Realini, L.; Rossau, R.; Jannes, G.; Mijs, W.; De Smet, L. A. K.; Portaels, F.; Van Den Eeckhout. Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2317-2319, 1999.

- Metchock, B.G.; Nolte, F.S. and Wallace Jr, R.J. Mycobacterium. In: Murray, P. R. (ed). Manual of clinical microbiology. 7th Edition. ASM, 1999.
- Mikusov, K.; Slayden, A. R.; Besra, G. S.; Brennan, P. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2484-2489, 1995.
- Miller, M.; Thibert, L.; Desjardins, F.; Siddiqi, S.; Dascal, A.; Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide: comparison of method with pyrazinamidase assay. J. Clin. Microbiol. 33: 2468-2470, 1995.
- Mitchison, D. A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. Tubercule. 66: 219-225, 1985.
- Miyagi, C., Yamane, N., Yogesh, B., Ano, H., Takashima, T. Genetic and Phenotypic characterization of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Japan. Diag. Microbiol. and Inf. Disease 48: 111-116, 2004.
- Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Detection of embB306 mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. J Clin Microbiol. 2002;40(10):3810-3.
- Morlock, G. P., J. T. Crawford, W. R. Butler, S. E. Brim, D. Sikes, G. H. Mazurek, C. L. Woodley and R. C. Cooksey. Phenotypic Characterization of *pncA* Mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. . Antimicrob. Agents Chemother. 44:2291-2295, 2000.
- Mshana, R. N.; Tadesse, G.; Abate, G.; and Miöner, H. Use of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide for rapid detection of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 36(5):1214-1219, 1998.
- Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Michael and R. H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2003.
- Musser, J. M.; Kapur, V.; Williams, D. L.; Kreiswirth, B. N.; Van Soolingen, D.; Van Embden, J. D.A.; Characterization of the catalase-peroxidase gene (*KatG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. J. Infect Dis. 173: 196-202, 1996.
- Musser, J.M. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. Clin Microbiol Rev, 8:496-514, 1995.
- Palomino, J. C, and Portaels, F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 18:380-383, 1999.
- Palomino, J. C. Novel rapid antimicrobial susceptibility tests for *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bastian, I and Portaels, F. Multidrug Resistant Tuberculosis. Academic Publisher, Netherland, 2000.
- Park, S, K., Lee, J. Y., Chang, C. L., Lee, M. K., Son, H. C., Kim, C. M., Jang, H. J., Park, H. K., and Jeong, S. H. 2001.pncA mutations in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates from Korea. : Bio Med Central Infect Dis.1:4
- Park, S, K., Lee, J. Y., Chang, C. L., Lee, M. K., Son, H. C., Kim, C. M., Jang, H. J., Park, H. K., and Jeong, S. H. 2001.pncA mutations in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates from Korea. : Bio Med Central Infect Dis.1:4

- Park, Y.Z.; Kim, B.J.; Ryu, S.; Kook, Y.H.; Choe, Y.K.; Bai, G. H., and Kim, S.J. Cross-resistance between rifampicin and KRM-1648 is associated with specific *rpoB* alleles in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 6(2):166-170, 2002.
- Pfyffer, G. S.; Bonato, D. A.; Ebrahimzadeh, A.; Gross, W.; Hotaling, J.; Kornblum, J.; Lazlo, A.; Roberts, G.; Salfinger, M.; Wittwer, F. and Siddqi, S. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the Proportion Method with solid media. *J Clin Microbiol*,37(10):3179-3186, 1999.
- Portugal, I., Barreiro, L., Moniz-Pereira, J., and Brum, L. 2004. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*. 7:2736-2738.
- Ramaswamy, S. and Musser, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber. Lung. Dis*. 79: 3-29, 1998.
- Ramaswamy, S. V.; Amin, A. G.; Goksel, S.; Stager, C. E.; Dou, S. J.; Sahly, H.E.; Moghazeh, S. L.; Kreiswirth, B. N.; Musser, J. M.; Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 44: 326-336, 2000.
- Rastogi, N.; Seng Goh, K.; David, H. L.; Enhancement of drug susceptibility of *Mycobacterium avium* by inhibitors of cell envelope synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 34: 759-764, 1990.
- Raviglione, M.C.; Sinder, D.E., and Kochi, A. Global epidemiology of tuberculosis – Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA*, 273:220-226, 1995.
- Ribeiro, M.O. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de oxi-redução para determinação da concentração mínima inibitória de *M.tuberculosis* para isoniazida e rifampicina e sua associação com mutações no gene *rpoB*. Dissertação de Mestrado em Clínica Médica, apresentada na UFRJ, 2004.
- Rinder, H.; Mieskes, K. T.; Tortoli E.; Richter, E.; Casal, M.; Vaquero, M.; Cambau, E.; Feldmann, K.; Loscher, T. Detection of *embB* codon 306 mutations in ethambutol resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum samples: a low-cost, rapid approach. *Mol Cell Probes* 15 (1) 37-42, 2001.
- Riska, P. F.; Ya S.; Bardarov, S.; Freundlich, L.; Sarkis, G.; Hatfull, G.; Carriere, C.; Kumar, V.; Chan, J.; and Jacobs JR, W. R. Rapid film-based determination of antibiotic susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a Luciferase Reporter Phage and the Bronx Box. *J Clin Microbiol*, 37(4):1144-1149, 1999.
- Rodrigues, V. F. S., Mello, F. C. Q., Ribeiro, M. O., Fonseca, L., Kritski, A. L., Rossetti, M. L. R., Zaha, A. Detection of *mycobacterium avium* in Blood Samples of Patients with AIDS by using PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. , v.40, p.2297 - 2299, 2002.
- Rodrigues, V. F. S., Telles, M. A.; Ribeiro, M. O., Cafrune, P. I.; Rossetti, M. L. R., Zaha, A. Characterization of *pncA* Mutations of Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol 49, p. 444-446, 2005
- Rossetti, M. L. R; Jardim, S. B.; Rodrigues, V. F. S.; Moura, A. R.; Oliveira, H. and Zaha, A.; Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J. Microbiol. Met.*, 28: 139-146, 1997.

Ruffino-Netto, A. Impacto da reforma do setor saúde sobre os serviços da tuberculose no Brasil. Bol Pneumol San, 7(1):8-18, 1999.

Scorpio, A and Zhang, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/ nicotinamidase, cause resistance to antituberculous drug pyrazinamide in tubercule bacillus. Nat. Med. 2: 662-667, 1996.

Scorpio, A., D. M. Collins, D. Whipple, D. Cave, J. Bates and Y. Zhang. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. J. Clin. Microbiol. 32:106-110, 1997a.

Scorpio, A; Lindholm-Lew, P.; Heifets, L.; Gilman, R.;Siddiqi; Cynamon, M. and Zhang,Y. Characterization of *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. 41: 540-543, 1997b.

Siddiqi, S. H.; Libonati, J. P.; and Middlebrook, G. Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 13(5):908-912, 1981.

Silva, M. S. N.; Senna, S. G.; Ribeiro, M. O.; Valim, A. R.; Telles, M. A.; Kritski, A. L.; Morlock, G. P.; Cooksey, R. C.; Zaha, A., Rossetti, M. L. R. Mutations in *katG*, *inhA* and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 41 (9): 4471-4474, 2003.

Silve, G. Vallero-Guillen, P. Quemard, A. Dupont, M. A. Daffe, M. Lanelle, G. Ethambutol inhibition of glucose metabolism in micobacteria. A possible target of the drug. Antimicrobial agents and Chemotherapy 37. 1536-1538. 1993.

Smith, P.G., and Moss, A.R. Epidemiology of tuberculosis (chapter 4). In: Bloom, B. R. (Ed.). Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington. ASM Press, 1994.

Snider, D. E.; Rogowski, J.; Zierski, M.; Bek, E.; Long, M. W. Successful intermittent treatment of smear-positive pulmonary tuberculosis in six months. Am Ver. Respir. Dis. 125: 265-267, 1982.

Soini, H., and Musser, J.M. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clinical Chemistry, 47(5):809-814, 2001.

Speirs, R. J.; Welch, J. T. and Cynamon, M. H. Activity of n-propyl pyrazinoate against pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis*: investigations into mechanism of action of and mechanism of resistance to pyrazinamide. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1269-1271, 1995.

Sreevatsan, S.; Pan, X, Zhang,Y.; Kreiswirth, B. N. and Musser, J. M. Mutations associated with pyrazinamidase resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. Antimicrob. Agents. Chemoter. 41: 636-640, 1997 a.

Sreevatsan, S.; Stockbauer, K..E.; Pan, X, Zhang,Y., Kreiswirth, B. N.; Moghazeh, S. L. and Jacobs Jr, W. R. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role *embB* mutations. Antimicrob. Agents. Chemoter. 41: 1677-168, 1997 b.

Stead, W.W., and Dutt, A.K. Epidemiology and host factors. In: Schlossberg, D. Tuberculosis. 2nd Edition, New York, 1989.

Suzuki, Y., Suzuki, A., Tamaru, A., Katsukawa, C., and Oda, H. 2002. Rapid detection of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by a PCR-based in vitro system. J Clin Microbiol. 2:501-7.

Takaiama, K.; Kilburn, J. O.; Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smigmatis*. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1493-1499, 1989.

Telenti, A.; Imboden, P.; Marchesi, F.; Lowrie, D.; Cole, S.; Colston, M. J.; Matter, L.; Schopfer, K. and Bodmer, T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet, 341: 647-650, 1993.

Telenti, A.; Philipp, W. J.; Sreevatsan, S.; Bernasconi, C.; Stockbauer, K. E.; Wieles, B.; Musser, J. M. and Jacobs Jr. W. R. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. Nat. Med. 3: 567-570, 1997 .

Thomas, J. P.; Baughn, C. O.; Wilkinson, R.G.; Shapard, R. G. Am, Ver. Resp. Dis 83. 891-893, 1961.

Tortoli, E.; Benedetti, M.; Fontnelli, A.; and Simonetti, M. T. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion. J Clin Microbiol, 40(2):607-610, 2002.

Tracevska T, Jansone I, Nodieva A, Marga O, Skenders G, Baumanis V. Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Res Microbiol. 155(10):830-4 2004.

Trujillo, W.F.C., and Kritski, A.L. Tuberculose. In: Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. Ed Cultura Médica, Rio de Janeiro, 2001.

Valim, A. R. M.; Rossetti, M. L. R.; Ribeiro, M. O.; and Zaha, A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brasil. J. Clin. Microbiol. 38: 3119-3122, 2000.

van Soolingen, D.; De Hass, P. E. W.; Hermans, P. W. .M. and Van Embden, J. D. A. Methods in Enzymology, 235: 196-204, 1994 .

Van Soolingen, D.; Hoogenboezem, T.; De Hass, P.E.W.; Hermans, P.W.M.; Koedam, M.A.; Teppema, K.S.; Brennan, P.J.; Besra, G.S.; Portaels, F.; Top, J.; Schouls, L.M. and Van Embden, J.D. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from África. Int J Syst Bacteriol, 47(4):1236-45, 1997.

Wade, M. M., Volokhov, D., Peredelchuk, M., Chizhikov, V., Zhang, Y. 2004 Accurate mapping of mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a scanning-frame oligonucleotide microarray. Diag. Microbiol.and Inf. Disease 49: 89-97.

Wayne, L. G. 1974. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1:147-51.

WHO. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 1994–1997. (WHO/TB/97.229). Geneva, Switzerland, 1997b.

WHO. World Health Organization. Anti-Tuberculosis drug resistance in the world. Report No.3. (WHO/CDS/TB/2004). Geneva. Switzerland, 2004b.

WHO. World Health Organization. TB – A Global Emergency. WHO report on the tuberculosis epidemic. (WHO/TB/94.177). Geneva. Switzerland, 1994.

WHO. World Health Organization. Tuberculosis. Fact Sheet no. 104. Disponível em <<http://www.who.int/health-topics/tb.htm>>. Acesso em: 23 mar 2004a.

World Health Organization. Report – Global Tuberculosis Control Surveillance Planning, Financing. 2002. Disponível em: <http://www.who.org>.

Yeager, R. L.; Munroe, W. G.; Dessau, F. I. Pyrazinamide (aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am. Ver. Tuberc.* 65:523-534, 1952.

Zhang, N.; Torelles, J. B.; McNeil, M. R.; Escuyer, V. E.; Khoo, K.; Brennan, P. J.; Chatterjee, D. The Emb Proteins Of Mycobacteria Direct Arabinosylation Of Lipoarabinomannan and Arabinogalactan Via Na N-Terminal Recognition Region and C-Terminal Synthetic Region. *Molecular Microbiology*, 50 (1), 69-76, 2003

Zhang, Y. and Mitchinson, D. The curious characteristics of Pyrazinamide: a Review *Int J Tuberc Lung Dis* 7(1): 6-21, 2003.

Zhang, Y. and Telenti, A. Genetics of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Genetics of Mycobacteria* 235-254, ASM Press, Washington, 2000.

Zhang, Y., Scorpio, A., Nikaido, H., and Sun, Z. 1999. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol.* 7:2044-9. Brown T. J., Tensel, O., and French, G. L. 2000. Simultaneous identification and typing of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by analysis of *pncA* and *rpoB*. *J Med Microbiol* 49:651-656

Zhang, Y., Scorpio, A., Nikaido, H., and Sun, Z. 1999. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol.* 7:2044-9.

9- ANEXOS

Isolados de *M. tuberculosis*

Incubados em meio Ogawa - (37°C) 4-6 semanas

Testes bioquímicos

Testes convencionais de susceptibilidade

Identificação de *M. tuberculosis* PZA resistente / EMB resistente

Extração de DNA protocolo CTAB (van Soolingen *et al.*, 1994)

Amplificação por PCR

genotipagem

gene *pncA* (380 pb)

gene *pncA* (350 pb)

gene *embB* (803 pb)

Análise (Gel Compar)

Detecção de DNA em gel de agarose 1.5%

Purificação dos produtos de PCR MicroSpin™ S-300 e S-400 HR Columns (Pharmacia)

Seqüenciamento automático Big Dye Terminator Cycle Kit (Applied Biosystems)

Análise de similaridade BLAST® e CROMAS versão 1.45

ANEXO 2

Lista dos Aminoácidos e os códons no código genético.

A	Ala	Alamina	GCA	GCC	GCG	GCU		
C	Cys	Cisteína	UGC	UGU				
D	Asp	Ácido Aspártico	GAC	GAU				
E	Glu	Ácido Glutâmico	GAA	GAG				
F	Phe	Fenilalanina	UUC	UUU				
G	Gly	Glicina	GGA	GGC	GGG	GGU		
H	His	Histidina	CAC	CAU				
I	Ile	Isoleucina	AUA	UAC	AUU			
K	Lys	Lisina	AAA	AAG				
L	Leu	Leucina	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
M	Met	Metionina	AUG					
N	Asn	Asparagina	AAC	AAU				
P	Pro	Prolina	CCA	CCC	CCG	CCU		
Q	Gln	Glutamina	CAA	CAG				
R	Arg	Arginina	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
S	Ser	Serina	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
T	Thr	Treonina	ACA	ACC	ACG	ACU		
V	Val	Valina	GUA	GUC	GUG	GUU		
W	Trp	Triptofano	UGG					
Y	Tyr	Tirosina	UAC	UAU				

Fonte: Bruce *et. al.*, 1996.

ANEXO 3

