

ÉRICA MARY PAVAN

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação Ciências Médicas da
Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP,
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a)
aluno(a) **Érica Mary Pavan**.
Campinas, 16 de dezembro de 2003.

M. Cecilia B. Villares
Prof(a). Dr(a). Maria Cecília Barisson Villares
Orientador(a)

**DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *rpoB*
ASSOCIADAS A *Mycobacterium tuberculosis*
RESISTENTES A RIFAMPICINA.**

CAMPINAS

2003



200407821

ÉRICA MARY PAVAN

***DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *rpoB*
ASSOCIADAS A *Mycobacterium tuberculosis*
RESISTENTES A RIFAMPICINA.***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre
em Patologia Clínica, área de Ciências Biomédicas.*

Orientador: Profa. Dra. Maria Cecilia Barisson Villares

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

CAMPINAS

2003

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	IT UNICAMP P288d
V	EX
TOMBO BC/	58032
PROC.	
C ☐	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/05/04
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00197117-2

BIBID 316924

P288d Pavan, Érica Mary
 Detecção de mutações no gene rpo β de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a rifampicina / Érica Mary Pavan. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Maria Cecília Barrison Villares, Marcelo de Carvalho Ramos
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tuberculose. 2. Mutação (Biologia). 3. Micobactérias. I. Maria Cecília Barrison Villares. II. Marcelo de Carvalho Ramos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Mestrado

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Cecilia Barisson Villares _____

Membros:

- **Profa. Dra. Maria Patelli Juliani Souza Lima** _____
- **Prof. Dr. Eduardo Mello de Capitani** _____
- **Prof. Dr. Plínio Trabassos** _____
- **Profa. Dra. Lucilaine Ferrazoli** _____

Curso de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, área de Concentração Patologia Clínica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/12/2003 14:00h Anfiteatro da Pós-graduação da FCM/UNICAMP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Leinir e Nelson (in memorian), que foram à base para a minha formação, pelo apoio e dedicação. Eles foram todo o exemplo de caráter e união que estão presentes em mim.

Ao meu marido e companheiro Jorge, pela paciência e generosidade.

Aos meus filhos Milena, Matheus e Miguel, que deixaram de ter minha atenção de mãe e ainda contribuíram para o meu crescimento.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora Maria Cecilia Barisson Villares, por tanto carinho, confiança e credibilidade.

Ao Professor Marcelo de Carvalho Ramos pelo incentivo, paciência e apoio técnico, tornando possível a realização desse projeto.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Adolfo Lutz, A Carmem M.S. Giampaglia, Lucilaine Ferrazoli e Dalva C. G. Aily, que apoiaram este estudo nos doando as cepas e aos pacientes, que mesmo indiretamente envolvidos colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do HC/UNICAMP. Aos Técnicos Rosa, Vagner Andrade e ao Farmacêutico-Bioquímico Marcel Loh em especial.

Ao Hemocentro/UNICAMP, em especial ao Dr. Fernando Ferreira Costa , que nos apoiou e cedeu-nos o uso dos aparelhos *Genephor* e Sequenciador Automático, ainda um agradecimento muito carinhoso a Maria Helena e a Dulcinéia M. de Albuquerque.

Aos colegas do Laboratório de Patogênese Bacteriana e Biologia Molecular da FCM/UNICAMP, Christian, Alessandra, Renata, Ana Lúcia, Mariângela, Arlete e Eliana, pelo apoio e auxílio nesse trabalho, um muito obrigado.

Aos meus colegas de Pós-graduação e aos docentes do DPC/UNICAMP.

Às minhas amigas: Eunice Grabert, pelo incentivo; Renata D. Pithon, pelo apoio e compreensão e Shirley pelo primeiro passo e por acreditar na minha capacidade.

À minha irmã , Elida Mary Pavan, que nos momentos mais difíceis deste período e na perda de nosso pai, esteve sempre presente e disponível para me ajudar com os meus filhos.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para esse trabalho.

Esse trabalho se tornou possível graças ao suporte financeiro da CAPES.

O meu profundo agradecimento!

SUMÁRIO

	<i>Pág.</i>
RESUMO	xxxvii
ABSTRACT	xli
1 - INTRODUÇÃO	45
1.1 - Classificação das Micobactérias.....	50
1.2 - Características Microbiológicas do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
1.3 - A Rifampicina.....	53
1.3.1 - Mecanismo de Resistência de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> à Rifampicina.....	54
1.4 - Rápida Detecção de micobactérias resistentes à Rifampicina.....	55
1.5 - Métodos de biologia molecular aplicados à epidemiologia da tuberculose.....	56
1.6 - Métodos fenotípicos e genotípicos para detectar resistência em <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	57
1.6.1 - Métodos Fenotípicos.....	57
1.6.2 - Métodos Genotípicos.....	58
1.6.2.1 - Sequenciamento de DNA.....	59
1.6.2.2 - Análise Heteroduplex.....	60

1.6.2.3 - Análise de hibridização de fase sólida.....	60
1.6.2.4 - Chemical Cleavage Mismatch (CCM).....	61
1.6.2.5 - DGGE (Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis).....	61
1.6.2.6 - PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).....	62
1.7 - Avanços no Diagnóstico.....	65
1.8 - Justificativas.....	65
2 - OBJETIVOS.....	69
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
3.1 – Casuística.....	75
3.2 - Identificação das Micobactérias.....	75
3.3 - Manutenção dos Isolados.....	76
3.4 - Extração do DNA Genômico.....	76
3.4.1 - Quantificação do DNA Extraído.....	77
3.4.2 - Eletroforese do DNA Extraído.....	77
3.5 - Digestão do DNA Genômico pela Enzima de Restrição.....	78
3.6 - Eletroforese.....	78
3.7 - Southern Blotting.....	78
3.7.1 - Preparação do Gel para o Southern Blotting.....	78
3.7.2 - Tratamento da Membrana depois do Southern Blotting.....	79

3.7.3 - Construção da Sonda Molecular.....	80
3.7.3.1 - Amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	80
3.7.4 - Marcação da Sonda.....	81
3.7.5 - Hibridização.....	81
3.7.6 - Detecção.....	82
3.7.7 - Análise dos Resultados.....	83
3.8 - SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).....	83
3.8.1 - Reação de PCR para o SSCP.....	83
3.8.2 - Aplicação das amostras de SSCP.....	84
3.8.3 - Detecção.....	85
3.8.4 - Análise de Resultados.....	87
3.9 - Sequenciamento.....	87
3.9.1 - Sequenciamento automático para detecção das bases mutantes.....	87
3.9.2 - Análise de Resultados.....	89
4 - RESULTADOS.....	91
4.1 - RFLP.....	93
4.2 - SSCP.....	93
4.3 - Sequenciamento Automático.....	96
5 - DISCUSSÃO.....	101

6 - CONCLUSÕES.....	107
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
8 - ANEXOS.....	127
Anexo 1 - Isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizados no estudo cedidos pelo Laboratório de Microbiologia - Seção de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do HC/UNICAMP, segundo a data do isolamento da amostra, sexo do paciente e droga que apresentava resistência.....	129
Anexo 2 - Isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizados no estudo cedidos pelo Instituto Adolfo Lutz (Laboratório de referência para Tuberculose do Estado de São Paulo), segundo a data do isolamento, sexo do paciente, droga que apresentava resistência e a procedência.....	131
Anexo 3 - Soluções Utilizadas.....	137
Anexo 4 - Representação Esquemática do método “Southern Blotting” por Capilaridade.....	143
Anexo 5 - Análise de Resultados do RFLP feito pelo programa computacional GelCompar II, versão 2. 5 (Applied Maths®, Kortrijk, Belgium).....	145
Anexo 6 - Ampliação os Oligonucleotídeos na Posição de 157 pb pela PCR.....	147
Anexo 7 - Purificação os Fragmentos de DNA Amplificados pela PCR.....	149
Anexo 8 - Extração do DNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	151
Anexo 9 - Artigo enviado em Julho/2003 para AAC (Antimicrobial Agents and Chemotherapy).....	153
Anexo 10 - Comprovante da submissão do artigo.....	163

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAC	Antimicrobial Agents and Chemotherapy
ATP	Adenosina trifosfato
CCM	Chemical Cleavage Mismatch
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFLP	Cleavage Fragment Length Polymorphism
CTAB	Brometo de N-cetil-N,N,N-trimetil amônio
D	Ácido Aspártico
DGGE	Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis
DNA	Ácido Dexorribonucleico
DPC	Departamento de Patologia Clínica
dNTP	Composto pelos quatro nucleotídeos (A-T-C-G)
DR	DNA repetitivo
FCM	Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP
H	Histidina
HC	Hospital de Clínicas /UNICAMP
HCl	Ácido Clorídrico
INH	Isoniazida

IS	Seqüência de Inserção
J	Joule
λ	Lambda
L	Leucina
L-J	Löwenstein-Jensen
M	Molar
mb	Mega bases
Met	Metionina
<i>M. intracellulare</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MRU	Mycobacterium Reference Unit
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minutos
NaOH	Hidróxido de Sódio
NAP	p-nitro- α -acetil-amino- β -hidroxipropionofenol

pb	Pares de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PhaB	Phage amplified Biologically
Phe	Fenilalanina
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PHLS	Public Health Laboratory Service
PSA	Prova de Sensibilidade aos Antimicrobianos
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RMP	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
P	Prolina
<i>PvuII</i>	Enzima de Restrição obtida do <i>Proteus vulgaris</i>
rRNA	RNA ribossômico
S	Serina
Subsp.	Subespécie
SDS	Sódio Duodecil Sulfato
SSC	Solução Salina de Citrato

SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris 89mM, Ácido Bórico 89mM e EDTA 2,5mM
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultra Violeta
µg	Micrograma
µL	Microlitro
V	Volts
V	Valina
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
Vol	Volume
Y	Tirosina

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 - Distribuição das cepas conforme as mutações encontradas relacionadas com o padrão de suscetibilidade as drogas de primeira linha usadas no tratamento da Tuberculose.....	96

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1 - Mapa circular do cromossomo de <i>M.tuberculosis</i> cepa padrão H37Rv (SMITH, 2003).....	51
Figura 2 - Lâmina de Esfregaço de Escarro corada pela coloração de Ziehl-Neelsen. Mostrando <i>M.tuberculosis</i> corados em rosa (fucsina).....	52
Figura 3 - Colônia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	52
Figura 4 - Aspecto da colônia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em meio sólido de Löwestein-Jensen.....	53
Figura 5 - Fórmula Estrutural, empírica e massa molecular da Rifampicina...	54
Figura 6 - Representação esquemática do processo de coloração realizado com nitrato de prata. O íon prata é adicionado(Ag^+), em seguida reduzido(Ag^0), e em uma reação auto-catalítica os íons prata restantes reduzem-se à prata metálica.....	64
Figura 7 - Transferência do DNA do gel para a membrana de nylon por Southern Blotting.....	79
Figura 8 - Filme de raio X para analisar padrão de bandas.....	83
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose corado pelo Brometo de Etídeo.....	84
Figura 10 - Aplicação das amostras em gel de poliacrilamida no aparelho GenePhor®.....	85
Figura 11 - Gel de poliacrilamida comparando cepa sensível (sem mutação) com as demais cepas (possivelmente mutantes).....	86

Figura 12 -	Sequenciamento automático analisado pelo Chromas®.....	89
Figura 13a -	Mutação no códon 531 TCG→TTG (Serina - Leucina).....	97
Figura 13b -	Isolado sem mutação.....	97
Figura 14a -	Mutação no códon 526 CAC→GAC (Histidina-Ácido Aspártico).	98
Figura 14b -	Mutação no códon 526 CAC→TAC (Histidina-Tirosina).....	98
Figura 15a -	Inserção Phe ₅₁₄ , Met ₅₁₅	99
Figura 15b -	Isolado sem mutação.....	99

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1 - Mutações verificadas em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistentes à rifampicina.....	56
Quadro 2 - Condições para eletroforese em gel de poliacrilamida do SSCP.....	85
Quadro 3 - Relacionando número das cepas, data de isolamento da cepa, a suscetibilidade, padrão do SSCP e número do gel SSCP, a análise dos clusters e as mutações presentes por sequenciamento.....	93



RESUMO

A isoniazida, a rifampicina e a pirazinamida, têm sido utilizadas no tratamento da Tuberculose em muitos países, inclusive no Brasil. A resistência das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aos antibióticos tem resultado em falência do tratamento e aumento do custo para o sistema de saúde. As *Mycobacterium tuberculosis* resistentes às drogas de primeira linha tem emergido e estas tem sido reportadas mundialmente.

Nas mutações no gene *rpoB* têm se evidenciado o mecanismo de resistência prevalente das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à rifampicina. A fim de caracterizar as bases genéticas da resistência às drogas, do *Mycobacterium tuberculosis*, foram analisadas mutações envolvendo a resistência à rifampicina utilizando os métodos SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) e sequenciamento. As cepas de MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) foram genotipadas e avaliadas quanto à suscetibilidade a rifampicina. Como resultado, foram encontradas 13 cepas sensíveis a rifampicina e 65 resistentes. O DNA genômico foi obtido de cada cepa e um fragmento constando de 157pb do gene *rpoB* foi amplificado, submetido ao SSCP e ao sequenciamento.

As mutações identificadas pertenciam a região do gene *rpoB* entre o códon 511 e 533. A S531L (44%) foi a mutação de maior prevalência, seguida das mutações H526D (21%), H526Y (3%), L533P (3%), D516V (3%) e a inserção Phe₅₁₄ e Met₅₁₅ (3%).



ABSTRACT

Isoniazid, rifampin, and pyrazinamide, have been used as the standard treatment for tuberculosis in many countries, including Brazil. Antimicrobial resistance among *Mycobacterium tuberculosis* strains results in increased morbidity, mortality and costs of health care. Control of tuberculosis is thus threatened by widespread emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* as reported worldwide.

Mutations in the *rpoB* gene seems to be the most prevalent mechanism involved in rifampin resistance among *M. tuberculosis* strains.

To characterize the genetic basis of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil, mutations involved in rifampin resistance were detected using single strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing studies. A sample consisting of 73 isoniazid resistant and 5 isoniazid sensitive isolates recovered from August, 1999 through September, 2000 was screened for susceptibility to rifampin. As a result, 13 susceptible, and 65 resistant strains were detected. Genomic DNA was obtained from each isolate, and a fragment consisting of 157 bp of the *rpoB* gene was amplified, and submitted to SSCP and sequencing studies. Mutations involving codon 511 through codon 533 were identified. S531L (44%) was the most prevalent mutation found, followed by H526D (21%), and H526Y, L533P, D516V, Ins Phe₅₁₄, Met₅₁₅ (3% each). Our study corroborates previous studies done in Brazil which identified S531L as the most prevalent mutation, and several other mutations on the same gene segment (codon 511 through 533).



1 - INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo álcool ácido resistente, é o responsável por causar a tuberculose, doença infecciosa debilitante e, em alguns casos, fatal. Constituindo um grave problema de Saúde Pública, principalmente nos países em desenvolvimento, onde prevalecem a miséria e a desnutrição. A tuberculose leva a óbito 32% dos indivíduos com aids, representando o triplo das mortes causadas por qualquer outra doença, mata mais mulheres do que todas as causas de mortalidade materna somadas e mais jovens e adultos que qualquer outra doença infecciosa (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2000).

Aproximadamente 2 bilhões de indivíduos no mundo estão infectados pelo bacilo e a maior parte vive nos países em desenvolvimento como Índia, China, Indonésia, Bangladesh, Nigéria, Paquistão, Filipinas, Congo, Rússia e Brasil. No momento atual, calcula-se que 25% a 30% da população brasileira estejam infectadas com o bacilo de Koch, com 90 mil casos da doença sejam notificados por ano, resultando em 5 mil óbitos ao ano. Esses dados não traduzem a total realidade, pois muitos casos são sub-notificados; por deficiências da rede de Saúde Pública, por dificuldades de diagnóstico e identificação dos enfermos que não procuram os postos de saúde. Estima-se que 130 mil novos casos surjam todos os anos, o que significa um risco para o controle da tuberculose. Havendo um atraso no diagnóstico, o que aumenta a propagação do bacilo pelo portador e piora o prognóstico do paciente (Ministério da Saúde, 1998).

A identificação das micobactérias e a prova de suscetibilidade aos antimicrobianos (PSA), realizadas pelas técnicas convencionais são trabalhosas e demoradas, pelas características de crescimento inerente a esse microrganismo. Quando há necessidade clínica de uma resposta rápida com relação à positividade da presença da micobactéria como agente etiológico, ou então, quanto a espécie, ou ainda quanto à suscetibilidade aos tuberculostáticos, os métodos convencionais não apresentam agilidade satisfatória. A automação por técnica radiométrica diminui o tempo de identificação e da PSA do *Mycobacterium tuberculosis* de 6 semanas para até 2 semanas (WOLINSKY, 1994).

O número de novos casos de tuberculose descritos nos Estados Unidos decresceu de 26.673 (10,5 casos para 100.000 pessoas) em 1992 para 18.361 (6,8 casos para 100.000 pessoas) em 1998. No período de 1995 a 1997, as resistências do *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida decresceu de 8,2% para 7,6% e à rifampicina, de 1,8% para 1,3%. Isso se deve ao programa de controle da tuberculose nos Estados Unidos. A prevalência da resistência primária a antituberculosstáticos é muito alta em países em desenvolvimento. O diagnóstico oportuno de resistência à drogas é muito importante para a continuação do sucesso do programa de controle da tuberculose, como tem ocorrido nos Estados Unidos (COOKSEY et al., 2000). Os resultados positivos obtidos pelos serviços de saúde norte-americanos mostram a importância e a necessidade da identificação das espécies de micobactérias isoladas de materiais clínicos, em plena acórdância com VILLARES-OLIVEIRA (1990) e LEITE et al. (1995).

A resistência do *M. tuberculosis* a drogas é causada por mutações cromossômicas que acontecem ao acaso e os genes envolvidos em cada uma das mutações não estão vinculados. Existe um certo número de microrganismos resistentes em uma população de bacilos selvagens. Quando o número de resistentes atinge uma proporção, estimada em 1% para a maioria das drogas tuberculostáticas, o sucesso terapêutico é menos provável e a população de bacilos é considerada resistente. Segundo os dados do Centro de Vigilância Epidemiologia em 2002, no estado de São Paulo a incidência de tuberculose era na proporção de 52,5/100.000 habitantes, o número de mortes atribuídas a tuberculose em 1998 era de 1.521 pacientes na proporção de 4,3/ 100.000 habitantes, o impacto da resistência as drogas não foi estudado neste período. De 1994 a 1997 foi estimada a resistência de MTB as drogas, em São Paulo; com 6,3% para isoniazida (INH), 2,9% para rifampicina (RMP), 7,1% para estreptomicina, 0,3% para etambutol e 0% para pirazinamida (COHN et al., 1997). Em 2000 foi estimada a multiresistência de MTB em conjunto com vários países, conforme definição da Organização Mundial de Saúde, em 0,9% de todos os casos de tuberculose (DYE et al., 2000).

A resistência do *M. tuberculosis* aos quimioterápicos de primeira linha em pacientes com aids é um fato observado em todo o mundo. A freqüente institucionalização dos doentes com aids, tanto em hospitais quanto em casas de apoio ou hospitais-dia,

favorecendo a sua convivência, torna preocupante a questão da disseminação de cepas de MTB resistentes. As normas de isolamento que são requeridas para pacientes internados, nem sempre são observadas, dada a precariedade do atendimento da maioria dos hospitais do Brasil. A transmissão de doença aos profissionais de saúde, como observado em outros países, também deve ser objeto de preocupação (RAMOS et al., 2000).

Em surtos epidêmicos recentes, como um surto nosocomial na cidade de Nova York, as micobactérias eram resistentes a sete drogas (IKEDA et al., 1995; JEREB et al., 1995; BIFANI et al., 1996; FRIEDEN et al., 1996 e AGERTON et al., 1997). Estes autores classificam como multirresistência a falta de resposta simultânea à rifampicina e à isoniazida. De fato, atualmente essas duas drogas são as mais eficientes disponíveis para o tratamento da tuberculose e a resistência das cepas infectantes a elas complica sobremaneira a terapêutica da tuberculose. Pode-se, no entanto, ampliar este conceito, estendendo a definição de multirresistência à falta de resposta dos bacilos a quaisquer das duas drogas de primeira linha, como definem JACOBS (1994) e AGERTON et al. (1999). No Brasil, a tuberculose multirresistente é, por definição, a resistência a pelo menos rifampicina e isoniazida e mais a uma ou mais das drogas utilizadas no tratamento da tuberculose (I Consenso Brasileiro de Tuberculose, 1997). Os bacilos resistentes são transmitidos da mesma maneira que os suscetíveis; através de aerossóis. Os indivíduos infectados expõem, ao tossir ou ao espirrar, grandes quantidades do bacilo que permanecem viáveis no ar, por períodos prolongados (SIMONE et al., 1994 e MIMS et al., 1999).

A prevalência de tuberculose resistente tem aumentado nos últimos anos segundo dados da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Estima-se que 50 milhões de pessoas no mundo estejam infectados com bacilos resistentes. Um estudo feito em vários estados brasileiros utilizou 5138 amostras de MTB. O estudo foi feito no período de 1995 a 1996. Das 5138 amostras, 545 (10,6%) amostras eram resistentes a pelo menos uma droga. Destas, 362 (66,4%) tinham resistência primária e 183 (33,6%) resistência secundária, a taxa de multirresistência foi de 21,3% (116 amostras) (BRAGA et al., 1999). O custo do tratamento de um caso de tuberculose é de R\$78,00. Mas no caso da tuberculose multirresistente, pode saltar para R\$8.500,00, sem levar em conta os custos hospitalares (Pesquisa Fapesp, 2002).

1.1 - CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS

As micobactérias são bastonetes ácido-resistentes, imóveis e não esporulados. Taxonômicamente posicionadas na ordem dos *Actinomycetales*, na família *Mycobacteriaceae* e no gênero *Mycobacterium* (DAVIS et al., 1973).

1.2 - CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

As micobactérias são bacilos finos com cerca de 60% do peso seco da parede constituída de ácidos graxos (micólicos) e ésteres de álcoois. Os ácidos micólicos têm uma cadeia grande com 70 a 80 átomos de carbono. As micobactérias são bacilos aeróbios estritos. O *Mycobacterium tuberculosis* tem uma velocidade de crescimento lento, seu tempo de geração é de 12 horas, a lentidão pode estar relacionada com a absorção demorada de nutrientes devido à grande quantidade de lipídeos na parede bacteriana. A temperatura ótima de crescimento é de 37° C. As micobactérias medem 1-10 micrômetros de comprimento por 0,2-0,6 micrômetros de largura. O tamanho do seu genoma é de 4,4mb, como mostra Figura 1, com predomínio de G-C (aproximadamente 70%) (MOORE et al., 1985; HOLT et al., 1994; COLE et al., 1998 e HATFULL et al., 2000).

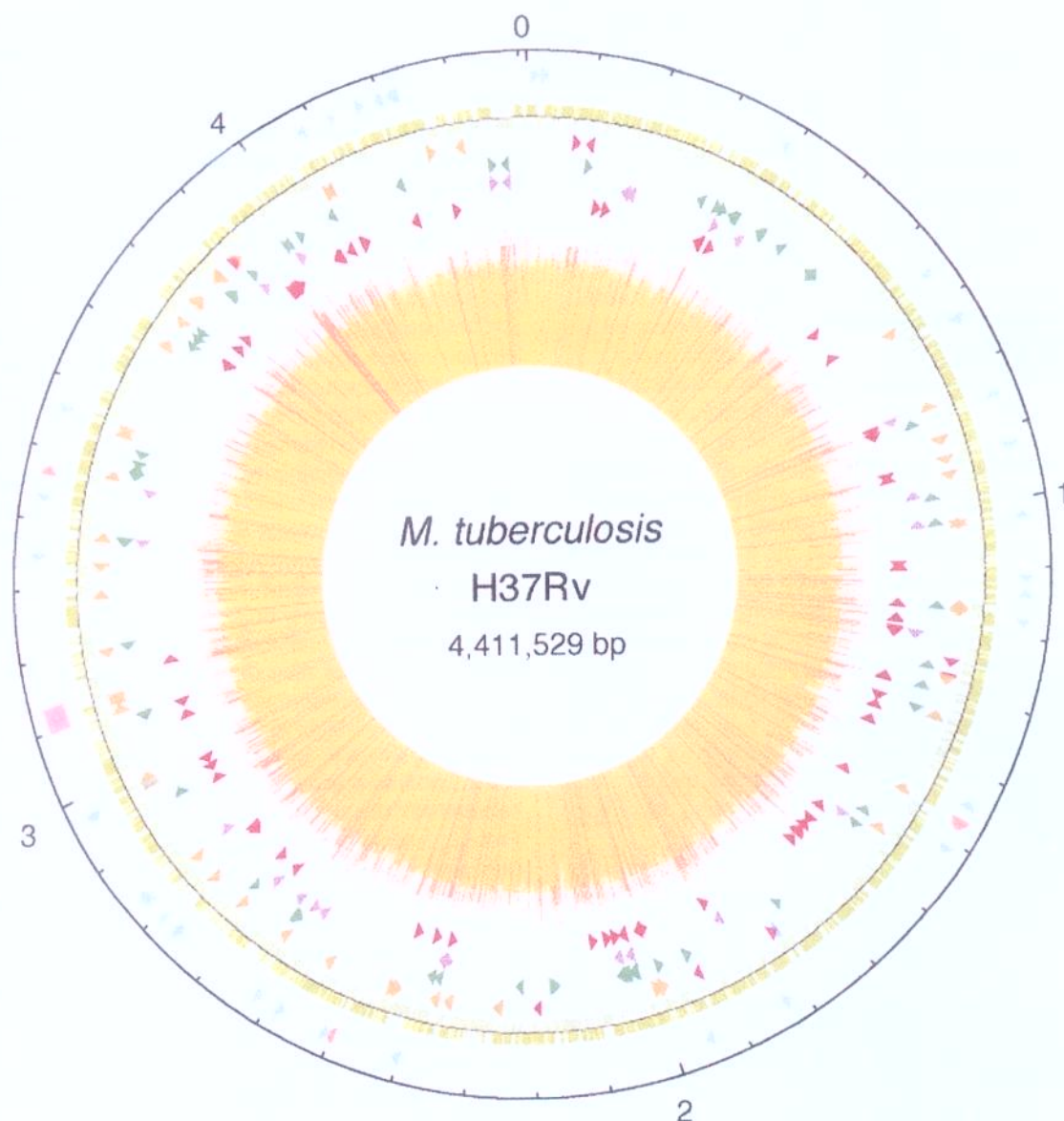


Figura 1 - Mapa circular do cromossomo de *M. tuberculosis* cepa padrão H37Rv (SMITH, 2003)

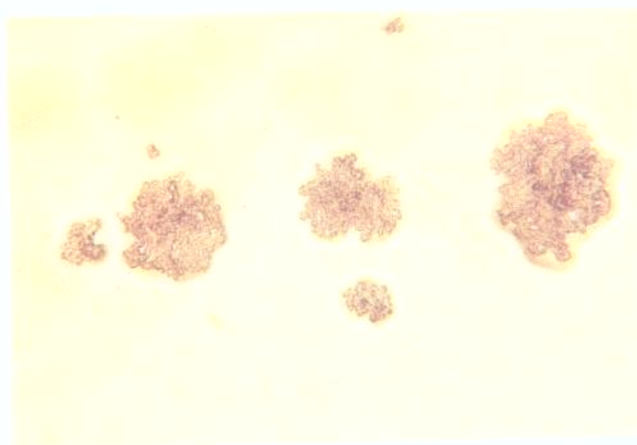
Elas são álcool-ácidos resistentes, isso significa que quando coradas pela fucsina, não se deixam descorar pela mistura de álcool e ácido clorídrico, isso pela presença de lipídeos na parede celular. O método de coloração utilizado é a de Ziehl-Neelsen conforme Figura 2. A maior resistência das micobactérias, a muitos antimicrobianos, pode estar ligada a presença dos lipídeos.



Atlas de Diagnóstico em Microbiologia MAZA et al. (1999)

Figura 2 - Lâmina de Esfregaço de Escarro corada por Ziehl-Neelsen. Mostrando *M. tuberculosis* corados em rosa (fucsina)

As amostras são cultivadas em meio sólido (Löwenstein-Jensen) ou meio líquido (Middlebrook7H9), as colônias em meio sólido são grandes, rugosas e formam rizóides. O aspecto da colônia de *M. tuberculosis* em meio sólido é mostrado na Figura 3 e na Figura 4.



Atlas de Diagnóstico em Microbiologia MAZA et al. (1999)

Figura 3 - Colônia de *Mycobacterium tuberculosis*



Atlas de Diagnóstico em Microbiologia MAZA et al. (1999)

Figura 4 - Aspecto da Colônia de *Mycobacterium tuberculosis* em meio sólido de Löwestein-Jensen

1.3 - A RIFAMPICINA

As rifamicinas são antibióticos produzidos pelo *Streptomyces mediterranei*. A rifamicina mais importante é a rifampicina, obtida no laboratório a partir da rifamicina SV. As características químicas da rifampicina são: um anel duplo, uma longa ponte alifática e uma cadeia lateral conforme mostra a Figura 5 (TRABULSI et al., 1996).

Fórmula química: $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$

Massa molar: 823g/mol

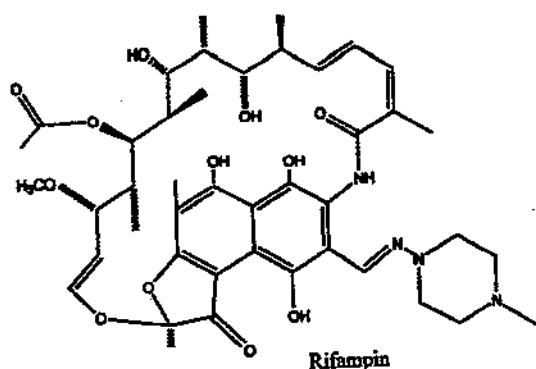


Figura 5 - Fórmula Estrutural, empírica e massa molecular da Rifampicina

A rifampicina é um agente antibiótico de amplo espectro, pois se difunde rapidamente por células hidrofóbicas. A RMP interfere na síntese do mRNA por ligação da RNA-polymerase. A RNA-polymerase é capaz de inativar a transcrição (GARDNER & SNUSTAD, 1986).

1.3.1- Mecanismo de Resistência de *Mycobacterium tuberculosis* à Rifampicina

As micobactérias são caracterizadas por serem altamente hidrofóbicas com uma barreira de permeabilidade efetiva. As cepas de MTB resistentes à RMP usam uma estratégia comum, a mutação na região de 69pb do gene *rpoβ*.

O gene *rpoβ* possui 3516pb e as mutações ocorrem da 1288pb a 1356pb. Três pequenas regiões são definidas por mutações no meio da subunidade β: Cluster I (a.a. de 512 a 534) HEEP et al. (2001), cluster II (a.a. de 563 a 574) e cluster III (a.a. 687), sendo as mais comuns as do cluster I, especificamente no a.a. 531 e em seguida no 526.

Em *Mycobacterium tuberculosis*, a resistência a rifampicina possui uma frequência de 1 mutante para 10^{10} organismos. Dos resistentes a região do gene *rpoB* é a responsável por uma prevalência maior que 95% (TELENTI et al., 1993 a,b).

Recentemente os trabalhos identificam mutações pontuais específicas, sendo a mutação S531L a de maior prevalência, seguida da H526Y conforme Quadro 1 (TELENTI et al., 1993 a,b; KAPUR et al., 1994; FELMLEE et al., 1995; LEITE et al., 1995; BODMER et al., 1995; TANIGUCHI et al., 1996; TELENTI et al., 1997; HIRATA et al., 1997; PIATEK et al., 2000; VALIM et al., 2000 e SPINDOLA DE MIRANDA et al., 2001).

1.4 - RÁPIDA DETECÇÃO DE MICOBACTÉRIAS RESISTENTES À RIFAMPICINA

Para detectar, com rapidez, as micobactérias resistentes à rifampicina foram desenvolvidos métodos moleculares. Através do estudo dos mecanismos de resistência as drogas, utilizados pelas cepas de MTB, foram desenvolvidas técnicas que detectam as mutações que levam a resistência. Dentre as técnicas destacaram-se a análise por sequenciamento e o método SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) desenvolvido por ORITA et al.(1989). O SSCP faz uma triagem das mutações pontiformes em fragmentos de fita simples de DNA. As mutações que ocorrem no gene *rpoB* de MTB são facilmente verificadas por este método (PIATEK et al., 2000).

Mutações pontiformes são mutações que resultam da substituição, da inserção ou da deleção de 1 par de bases por outro. No gene *rpoB* o códon 531 sofre uma mutação com a troca de base C que codificaria o aminoácido Serina por uma T que passa a codificar uma Leucina. (TCG→TTG) em 56,2%. E no códon 526 a mutação pontiforme ocorre na troca de A que codificaria uma Hisididina por uma C que passa a codificar uma Prolina (CAC→CCC) em 6,2%, ou a CAC (Histidina) sofreria mutação para CTC (Leucina), AAC (Asparagina) ou CGC (Arginina) segundo SPINDOLA et al. (2001). Conforme representado no Quadro 1 segundo TELENTI et al.(1993a), o códon 531 as mutações

ocorriam em 51,5%, TCG codificando Serina poderia então ser modificado em TTG (Leucina) , CAG (Glutamina) ou TGG (Triptofano). Já o códon 526 CAC codificando o aminoácido Histidina sofreria mutação (28%) para TAC (Tirosina), GAC (Ácido Aspártico), CAG (Glutamina), AAC (Asparagina), CGC (Arginina) ou CCC (Prolina) (MIKHAILOVICH et al., 2001).

Quadro 1 - Mutações verificadas em *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à rifampicina

	Leu	Ser	Gln	Phe	Met	Asp	Gln	Asn	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	His	Lys	Arg	Arg	Leu	Ser	Ala	Leu	
511	CTG	AGC	CAA	TTC	ATG	GAC	CAG	AAC	AAC	CCG	CTG	TCG	GGG	TTG	ACC	CAC	AAG	CGC	CGA	CTG	TCG	GCG	CTG	533
	Pro CCG	Leu CTA				Val GTC	Del.				Leu TTG					Tyr TAC Asp GAC Gln CAG Asn AAC Arg CGC Pro CCC				Leu TTG Gln CAG TRP TGG		Pro CCG		

1.5 – MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADOS À EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

Alguns métodos que caracterizam a constituição das micobactérias são propostos, como: a cromatografia gasosa usada para a identificação a nível de espécie (TISDALL et al., 1982). A caracterização dos surtos causados por micobactérias, pode ser feita de muitas maneiras, com a análise de fragmentos polimórficos com enzimas de restrição, com eletroforese em campo pulsado (PFGE) ou caracterizando a posição (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism), com as sequências de inserção (IS) e sequências curtas de DNA repetitivo (DR) entre outras (van SOOLINGEN et al., 1998). A técnica RFLP é muito sensível e elaborada, que detecta variações genotípicas entre os membros do “complexo *M. tuberculosis*”. Esse método é padronizado e utilizado mundialmente para o estudo genotípico de cepas de *M. tuberculosis*, de acordo com van EMBDEN et al. (1993).

A identificação por seqüências de rRNA 16S é bastante usada e levou a confecção de testes rápidos, comercialmente produzidos pela Gen-Probe Inc. (San Diego, Califórnia, USA) com alta sensibilidade (cerca de 95%) para o “complexo *M. tuberculosis*” FRONTHINGHAM & WILSON (1993).

Exemplares de uma espécie terão o mesmo mapa genético, porém com diferenças na seqüência de dextrorribonucleicos. Essas diferenças são chamadas de polimorfismo. O gene terá diferenças na seqüência de DNA, entre os membros da mesma espécie as variações são chamadas de RFLP. Os “Southern blot” são usados para detecção destas RFLPs. Onze elementos de inserção tem sido descritos nas micobactérias, destacam-se a IS6110, IS1081, IS1547 e os “IS-like element” (THIERRY et al., 1990; MARIANI et al., 1997; FANG et al., 1998 e KREMER et al., 1999). A seqüência IS6110 pode ter uma grande variação de cópias no genoma, a IS1081 está presente de 5 a 7 cópias e as demais apresentam de 1 a duas cópias somente. O RFLP com a IS6110 é o método de tipagem com melhor padronização e o mais usado (THIERRY et al., 1990; van EMBDEM et al., 1993 e van SOOLINGEN et al., 1999).

1.6 - MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS PARA DETECTAR RESISTÊNCIA EM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

1.6.1 – Métodos Fenotípicos

Tanto os países desenvolvidos como os países em desenvolvimento precisam de métodos mais rápidos para a suscetibilidade aos tuberculostáticos. Em decorrência desse fato desenvolveu-se o método das proporções (CANNETTI et al., 1963) num sistema de leitura radiométrica, o BACTEC® utilizando meio líquido (MIDDLEBROOK et al., 1977). O sistema BACTEC® apresenta um risco de radioatividade, apesar de ser eficiente e rápido. Outro método foi desenvolvido, para suprir o problema da radioatividade, o método MGIT®, que se mostra eficiente, rápido e não radiométrico (PFYFFER et al., 1997).

Outro método, desenvolvido por JACOBS et al. (1993) utiliza micobacteriófagos (virus específicos que fagocitam micobactérias), onde a suscetibilidade as drogas pode ser medida com micobacteriofagos modificados geneticamente, com genes

lux e luciferase. As micobactérias resistentes crescendo na presença dessas drogas são capazes de produzir luz. Pela presença da enzima luciferase, que catalisa a luciferina, liberando ATP. Os ATP geram fótons de luz que são detectados no luminômetro, as sensíveis morrem e assim não produzem luz. Tal equipamento é de alto custo, porém não requer que os técnicos que o utilizam tenham qualquer noção de bases moleculares.

O PhaB (Phage amplified Biologically) é um método mais acessível, pois não utiliza o luminômetro. Ele também utiliza os micobacteriófagos, mas de maneira diferente da descrita por JACOBS et al. (1993). Os micobacteriófagos são replicados no interior das células das micobactérias, ocorrendo a lise celular e a liberação dos fagos que são inoculados sobre uma membrana de *M. smegmatis*. Quantificam-se os vírus descendentes e isso indica os *M. tuberculosis* que vieram da amostra original. O método é rápido e simples, a sensibilidade é calculada na contagem das bactérias (>10-100 micobactérias/ml) e o método é muito seguro, pois os *M. tuberculosis* estão mortos pela ação dos fagos.

1.6.2 – Métodos Genotípicos

Ensaio genotípicos combinam 3 etapas principais: a) preparo das amostras de DNA; b) amplificação da parte relevante do gene estudado por PCR (Polymerase Chain Reaction) e c) detecção da mutação comparando-as com as cepas selvagens.

Para a detecção de mutações muitos métodos são propostos. Alguns métodos foram testados em estudos realizados no Reino Unido pelo Public Health Laboratory Service (PHLS) – Mycobacterium Reference Unit (MRU); tais como: sequenciamento de DNA, Análise Heteroduplex, Análise de hibridização de fase sólida e PCR-SSCP, (DROBNIEWSKI & WILSON, /1998).

1.6.2.1 - Sequenciamento de DNA

O sequenciamento manual foi desenvolvido no final da década de 70, para que fosse possível a determinação da ordem linear de bases de um fragmento de DNA. Para tal, foram utilizadas duas abordagens: a química, por MAXAM & GILBERT (1977) e a enzimática, sendo esta última, o procedimento padrão utilizado atualmente.

O método enzimático é baseado na síntese de DNA *in vitro* na presença de nucleotídeos trifosfatados terminadores de cadeia. Estes nucleotídeos análogos são didesoxinucleotídeos (ddNTPs), que ao serem incorporados impedem a progressão da síntese, pois na posição 3' do carbono do açúcar existe um hidrogênio ao invés de um grupo hidroxila, o que impede a ligação fosfodiéster com o nucleotídeo seguinte. Para a determinação da sequência completa, quatro nucleotídeos trifosfatados terminadores de cadeias (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) são utilizados em separado, em reações de síntese de DNA, a partir do mesmo molde de DNA de fita simples e do mesmo oligonucleotídeo iniciador "*primer*". As bandas que se formam no gel de poliacrilamida, pela migração diferencial dos fragmentos, são identificadas através da marcação radioativa (MAXAM & GILBERT, 1977). O sequenciamento manual, no entanto, é um procedimento dispendioso, demorado, que é ainda mais trabalhoso quando o gene analisado é complexo e com grande número de exons, além de empregar isótopos radioativos.

O sequenciamento automático baseia-se no mesmo princípio que o manual, porém são utilizados fluoróforos para a marcação das bases, que serão lidas posteriormente por um seqüenciador, aparelho com fotomultiplicador que detecta a luz emitida pelos fluorocromos excitados e os registra através de um eletroferograma (ADAMS et al., 1994). Este seria o método ideal para a análise de mutações devido à simplicidade, rapidez e precisão, porém a sensibilidade na detecção de uma simples mutação de ponto ainda deixa a desejar, particularmente em genes ricos em G-C, como os da globina α . Além disso, o seqüenciador é ainda um equipamento de custo elevado para grande parte dos laboratórios.

A análise de sequenciamento do DNA é o método padrão para a análise de mutações (BROWN, 1999). No caso específico da rifampicina, as mutações estão relacionadas, diretamente, com a resistência, porém, em outros genes pequenas mutações

podem não estar ligadas a resistência a drogas. Como por exemplo, um sítio comum de mutação na região do *kat G* não atua efetivamente na atividade da enzima catalase, ação da isoniazida (MUSSER et al., 1995; HEYM et al., 1995 e COCKERILL et al., 1995). Em resumo, o sequenciamento manual requer um nível alto de competência técnica e ainda utiliza radioisótopos, o que torna a técnica difícil e com um certo grau de risco ao técnico de laboratório. O sequenciador automático, por sua vez é um equipamento caro, mas seu funcionamento está baseado na fluorescência, eliminando o risco de radioatividade. Os dados são obtidos em 24-48 horas. Ele está sendo utilizado também para detectar mutações nos genes *gyrA*, *rrs* e *rpsL* associados a resistência a ciprofloxacina e estreptomicina, respectivamente (FINKEN et al., 1993; TAKIFF et al., 1994 e COOKSEY et al., 1996). No caso da rifampicina muitos trabalhos envolvendo o gene *rpoB* foram analisados somente por sequenciamento (KAPUR et al., 1994; TANIGUCHI et al., 1996 e MANI et al., 2001).

O sequenciamento do DNA é a maneira mais eficientemente de caracterizar uma mutação de um único nucleotídeo. A caracterização das mutações pontiformes é um pré-requisito para desenvolver testes de diagnóstico molecular eficientes (KELLER & MANAK, 1993).

1.6.2.2 - Análise Heteroduplex

Neste método, o DNA do organismo testado é amplificado e misturado às cepas sensíveis à droga a ser estudada. O DNA é desnaturado e congelado. Ocorre a produção de um DNA híbrido de fita dupla, havendo um pareamento das bases complementares.

O heteroduplex tem uma mobilidade durante a eletroforese em gel diferente do homoduplex (quando a cepa teste não tem mutação). Esse método foi aplicado com sucesso em cepas resistentes à rifampicina (WILLIAMS et al., 1994). Este método é muito sensível a inserção ou deleção de base simples.

1.6.2.3 - Análise de hibridização de fase sólida

COOKSEY et al. (1997) utilizaram uma membrana sólida complementar à fita amplificada, o fragmento amplificado por PCR, por exemplo, do gene *rpoB* e seu reverso, é hibridizado na membrana contendo sondas. As falhas do DNA amplificado ao se ligar a

qualquer uma das sondas indicam que a mutação pode caracterizar resistência. Se houver hibridização para qualquer uma das provas de mutação específica, então se caracteriza a mutação diretamente. Para a rifampicina, gene *rpoβ*, as sondas incluem apenas algumas mutações mais frequentes, e as deleções e inserções não são detectadas por este sistema.

1.6.2.4 - Chemical Cleavage Mismatch (CCM)

É um método de clivagem para detecção de mutações que utiliza interações químicas. A quebra ocorre no sítio de mutação ou nos nucleotídeos envolvidos na mutação específica. Esse método foi trabalhado por BAHRMAND et al. (2000) detectando mutações no gene *rpoβ* associadas a resistência à rifampicina. Em outro trabalho (SREEVATSAN et al., 1998) a clivagem foi comparada com SSCP e RFLP para mutações nos genes *katG* e *rpoβ* de *Mycobacterium tuberculosis*. O CFLP (Cleavase Fragment Length Polymorphism) para mutações no gene *katG* foi a mais eficiente que os demais métodos e para o *rpoβ* todos os métodos tiveram a mesma sensibilidade (COOKSEY et al., 2000). O DNA-DNA heteroduplex são preparados e incubados com compostos químicos que reconhecem as regiões ou bases específicas de mutação. A piperidina corta os DNA heteroduplex na base que ocorre a mutação. É a clivagem detecta a mutação. Algumas regiões com mutações não quebram e a sensibilidade é de 50%. A clivagem pode gerar resíduos e a similaridade de tamanhos de fitas pode deixar de ser lida. Um outro método químico identifica mutações por imunomicroscopia de complexo de carbodimida. A carbodimida modificará as bases mutantes em heteroduplex e esses podem ser imunoquimicamente ligados a partículas densas de elétrons e visualizados por microscopia eletrônica.

Os métodos químicos não são aplicados em larga escala, sendo métodos trabalhosos e com sensibilidade baixa (SREEVATSAN et al., 1998).

1.6.2.5 - DGGE (Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis)

Este método necessita de um equipamento de eletroforese específico. Ele pode ser usado em PCR ou fragmentos de restrição. A formação do heteroduplex não é necessária, mas melhora a resolução. O DGGE é baseado no comportamento do DNA sob

várias condições de desnaturação. Para fragmentos de DNA ricos em G-C, o DGGE funciona melhor que com os ricos em A-T. Foi testado por SCARPELLINI et al. (1999) para detectar as cepas resistentes à rifampicina .

1.6.2.6 - PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Esse método de análise envolve a estrutura terciária da proteína do DNA e é confirmada por sequenciamento. A mutação está presente quando as 2 fitas simples diferem em uma ou mais bases. As estruturas terão uma conformação diferente e isso levaria a mobilidade diferente no gel de poliacrilamida (ORITA et al., 1989). O SSCP tem sido utilizado em cepas resistentes a rifampicina, cirpofloxacin, isoniazida e estreptomicina (TELENTI et al., 1993 a,b; HEYM et al., 1995 e TELENTI et al., 1997). O SSCP era um método radioativo e coloração por brometo de etídeo, porém atualmente utiliza-se uma coloração por prata eliminando riscos ao laboratorista. É um método que precisa da confirmação por sequenciamento para detectar se a migração das bandas correspondem as mutações descritas.

O método foi chamado de *Single Strand Conformation Polimorphism* (SSCP), mas também vem sendo referido como SSCA - *Single Strand Conformation Analysis*, pois foi primeiramente utilizado para a análise de seqüências polimórficas (ORITA et al., 1989). Atualmente, o SSCP vem sendo utilizado para a detecção de mutações em genes responsáveis por várias doenças hereditárias, mutações somáticas em oncogenes ou em genes supressores de tumores, podendo também ser útil na detecção de polimorfismos ligados a genes de interesse ou mesmo servir como marcador de locus em mapa de ligação.

A técnica baseia-se no princípio de que moléculas de fita simples de DNA formam, sob condições não desnaturantes, diferentes estruturas secundárias que são estabilizadas por interações intra-fita. Portanto, moléculas que venham a diferir pela simples substituição de uma única base, podem formar diferentes estruturas com relação ao seu tamanho e superfície, e apresentarão diferentes migrações na eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante. Estas seqüências variantes, que aparecem como bandas com diferentes mobilidades eletroforéticas, são denominadas *confômeros*.

O SSCP tem sido considerado o método mais sensível para detectar variações nas seqüências em produtos de PCR de, no máximo, 200 pares de base, sendo sugerido que a detecção se torna menos sensível quando grandes fragmentos de DNA são analisados. Também foi evidenciado que há um tamanho mínimo para que a detecção seja eficaz, o que coloca o tamanho ótimo do fragmento a ser analisado em torno de 150 pb - detecção de cerca de 97%.

Estudos mostram que a percentagem na detecção da substituição de uma única base em fragmentos de 100-300 pb chega a um valor superior a 90%, e, em fragmentos de 300-450 pb, a cerca de 75%. A sensibilidade do SSCP tende, portanto, a decair com o aumento do tamanho do fragmento. Para evitar este fato, seqüências longas podem ser divididas em fragmentos menores. Para isso, pode-se utilizar duas formas diferentes: amplificar a seqüência alvo em fragmentos menores ou amplificar um fragmento longo e posteriormente clivá-lo com enzimas de restrição adequadas.

O SSCP possui dois métodos de revelação: o radioativo e o não-radioativo: na primeira, mais sensível, utiliza-se isótopos radioativos, incorporados na reação de PCR (ORITA et al., 1989), enquanto que, na segunda, pode-se utilizar a coloração do gel pela prata (HAYASHI et al., 1992).

Ultimamente, a coloração pela prata vem tomando o lugar dos radioisótopos, devido à sua praticidade, rapidez, menor risco e boa sensibilidade.

A coloração pela prata é um método muito sensível de impregnação permanente de ácidos nucleicos em géis de poliacrilamida, e que possui cinco etapas principais: a *fixação*, quando o gel é tratado com um ácido, com o intuito de reter as macromoléculas neste suporte, não permitindo que as mesmas se difundam durante a coloração, além de retirar outras substâncias que possam interferir, tais como tampões e detergentes iônicos; a *sensibilização*, quando são utilizados reagentes que modificam as proteínas, tornando-as mais reativas à prata; a *impregnação pela prata*, quando o gel é tratado com nitrato de prata, em condições levemente ácidas, para prevenir que o íon prata seja reduzido, após o que o gel é lavado para a retirada do excesso de corante de sua superfície; a *revelação*, quando se utiliza uma solução com formaldeído que reduz o íon prata em prata metálica (reação que só ocorre em pH elevado, fornecido pelo carbonato de sódio), e a *preservação*, realizada através do glicerol, que evita rachaduras no gel após sua secagem.

Como muitas dessas soluções oferecem riscos para quem as manipula, pode-se optar pelo sistema de automação do processo de coloração com o aparelho *Hoefer Automated Gel Stainer* (Pharmacia Biociences).

Neste processo, os géis de poliacrilamida são impregnados com o íon prata solúvel (Ag^+) e revelados pelo tratamento com um agente redutor. As macromoléculas no gel promovem a redução do íon prata para a prata metálica (Ag^0), que é insolúvel e, portanto, permite a visualização das bandas contendo ácidos nucleicos. A deposição inicial da prata metálica promove depósito adicional em um processo autocatalítico, o que resulta em alta sensibilidade [Figura 6].

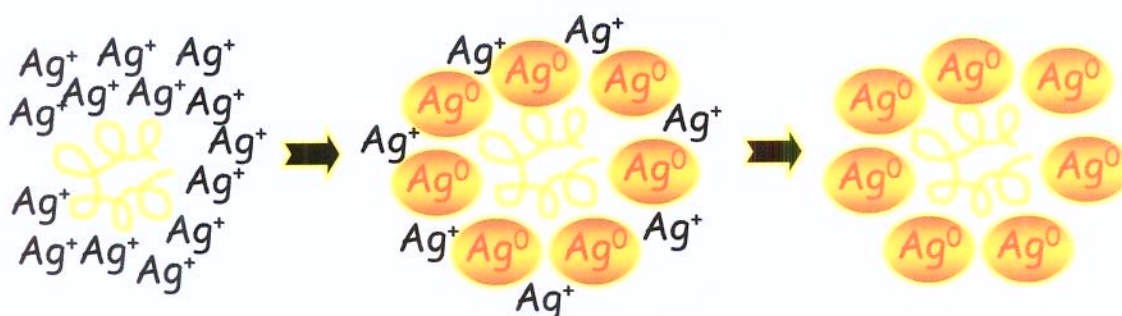


Figura 6 - Representação esquemática do processo de coloração realizado com nitrato de prata. O íon prata é adicionado (Ag^+), em seguida reduzido (Ag^0), e em uma reação auto-catalítica os íons prata restantes reduzem-se à prata metálica

Em resumo o método mais utilizado para fazer a triagem das mutações em fragmentos de gene pequenos (100-300pb) é o PCR-SSCP, ele tem sido usado para estudo de mutações no gene *rpoB* associadas a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à rifampicina, estas mutações são confirmadas por sequenciamento (FELMLEE et al., 1995 ; SCARPELINI et al., 1997; SELVAKUMAR et al., 1997 e BODADILLA-del- VALLE et al., 2001).

1.7 - AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO

Existem trabalhos que indicam outros métodos que apesar de terem um custo elevado, são rápidos e eficazes. Foi desenvolvido um kit para detectar diretamente do material clínico tratado, a presença de *M.tuberculosis* com mutação na região do gene *rpoβ*, onde ocorrem as mutações associadas a resistência à rifampicina (ROSSAU et al., 1997 ; GONZALES et al., 1999 e OLIVEIRA et al., 2003). Outros kits estão sendo estudados com mutações no gene *katG*, associado a resistência à isoniazida (VIADER-SALVADO et al., 2003).

Outras provas e testes vem sendo desenvolvidos como o biprobe que detecta mutações na região do gene *rpoβ* (EDWARDS et al., 2001), testado também em isoniazidas e rifampicinas resistentes na Espanha (TORRES et al., 2000). Muitos outros países estão preocupados em identificar e tratar rapidamente os *M. tuberculosis* resistentes antes que ocorram surtos epidêmicos como na Índia, na China, na Itália e no Kuwait, respectivamente (MANI et al., 2001; HUANG et al., 2002; CINGOLANI et al., 1999 e AHMAD et al., 2002).

A detecção precoce da possibilidade de resistência seria de grande valia em casos de surtos e na rotina de laboratórios clínicos (BIFANI et al., 1999), aumentando muito a possibilidade de um tratamento eficaz e controle da tuberculose multirresistente. Dentre as estratégias moleculares de diagnóstico, já citamos o RFLP, SSCP e sequenciamento utilizados em nosso estudo.

1.8 - JUSTIFICATIVAS

O estabelecimento de uma banco de dados internacional das genotipagens do DNA de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* permitirá que seja acessado para estudos epidemiológicos em escala global. A genotipagem do DNA das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de diferentes países já tem como resultado a relação entre tipos particulares de DNA e sua origem geográfica (van SOOLINGEN et al., 1991; van SOOLINGEN et al., 1993 e CALUSNI et al., 2003). Uma vez estabelecido, o banco de genótipos auxiliará no

conhecimento da disseminação global da tuberculose, como também no melhor entendimento de pontos-chave da epidemiologia, tais como: o impacto da infecção pelo HIV; surtos e em instituições de confinamento (presídios); a migração regional e global; a resistência a drogas contra a tuberculose e a sugestão de estratégias e métodos efetivos para a diminuição da transmissão dessa doença (ALLAND et al., 1994; van SOOLINGEN & HERMANS, 1995; AGERTON et al., 1997; PABLOS-MENDEZ et al., 1998; BIFANI et al., 1999; AGERTON et al., 1999 e BIFANI et al., 2002).

O Projeto Global de Vigilância à Resistência a drogas anti-tuberculose representa um esforço de coordenação internacional, tem como uma das mais importantes atividades a vigilância de resistência a drogas tuberculostáticas. O laboratório de micobactérias padronizado e qualificado assegura que esse propósito se realize (PABLOS-MENDEZ et al., 1998).

No acordo verbal do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia e VIII Simpósio Brasileiro em Micobactérias realizado em outubro de 1999 em Salvador-BA, ficou acordado que os centros que já possuíam tecnologia para a realização dos “RFLPs” e da qualificação das mutações associadas a resistência as drogas de primeira linha do esquema triplice (Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida), se comprometiam em estudar as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (resistentes a drogas) e os genótipos de regiões menos favorecidas, onde ainda não estavam realizando essas técnicas.

Os objetivos do acordo seriam:

1. Padronizar os “RFLPs” do Estado de São Paulo;
2. Verificar se a cepa W, que colocou em alerta máximo nos programas de vigilância sanitária nos EUA a partir de 1991, coincide com algum dos genótipos e
3. Procurar mutações que ocorrem nos genes específicos de *Mycobacterium tuberculosis* associadas à resistência as drogas aconselhado pelo pesquisador do CDC e no VIII Simpósio Brasileiro em Micobactérias em 1999 (COOKSEY et al., 1996)

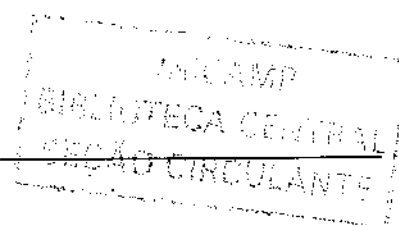
Por esses motivos a partir de novembro de 1999 o Laboratório de Micobactérias/DPC/HC/UNICAMP e a Disciplina de Moléstias Infeciosas CM/HC/UNICAMP tem unido esforços para estudar as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* o que resultou neste estudo e em muitos outros trabalhos como os de RAMOS et al. (2000), PANUNTO et al. (2003) e CALUSNI et al. (2003).

Há informações limitadas na prevalência de mutações específicas nos códons da região com 69pb do gene *rpoB* para a resistência específica da rifampicina em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* em nosso país. Por isso, resolvemos avaliar um método rápido para testar a suscetibilidade a drogas tuberculostáticas, a eficiência do método SSCP e do sequenciamento.



2 - OBJETIVOS

1. Determinar, através da técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP), a variabilidade existente entre os isolados de *Mycobacterium tuberculosis* da bacterioteca do Instituto Adolfo Lutz e da bacterioteca do laboratório de Microbiologia Clínica –Setor de Micobactérias do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC/UNICAMP)
2. Detectar as mutações no gene *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*, através da técnicas de Single Strand Conformation Polimorphysm (SSCP) e do sequenciamento, verificando a associação entre as mutações na região do gene *rpoB* e a resistência à rifampicina.





3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho é um estudo retrospectivo de dados obtidos em estudos com a única condição de serem cepas resistentes a pelo menos uma droga e algumas cepas sensíveis, utilizadas para padronizar as técnicas.

3.1 - CASUÍSTICA

UNICAMP - Foram selecionadas 10 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, destas 6 com resistência a pelo menos uma droga e 4 sensíveis da coleção de micobactérias do Laboratório de Microbiologia Clínica da Divisão de Patologia Clínica do HC/UNICAMP, obtidas de amostras de pacientes atendidos em diversos setores do HC/UNICAMP, no período de julho e agosto de 2001. [Anexo 1]

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – Foram gentilmente cedidas 89 cepas de MTB pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) do Laboratório Central, em São Paulo. As cepas foram selecionadas, com a condição de, serem resistentes a pelo menos uma droga. As cepas tinham procedência de diversas cidades do Estado de São Paulo e foram coletadas no período de agosto de 1999 a setembro de 2000. [Anexo 2].

3.2 - IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS

Somente as cepas da UNICAMP foram identificadas. As cepas do IAL já vieram sementeadas em L-J e foram ressemeadas para a manutenção.

O material clínico (escarro) foi enviado ao Setor de Micobactérias da DPC/HC/UNICAMP, onde foi realizada a baciloscopia corando-se as lâminas pela técnica de Zehl-Neelsen e a descontaminação das amostras pelo método de Petroff modificado.

O isolamento foi feito pelo sistema BACTEC 460 TB - radiométrico (Becton & Dickson®, USA). Nos frascos com leitura positiva, foi feito o teste do NAP, a fim de diferenciar o “complexo *M. tuberculosis*” dos demais. Os isolados positivos para *M. tuberculosis* foram então sementeados em meio de cultura de Löwenstein – Jensen (L-J) à 37°C para a observação das características fenotípicas das colônias e a obtenção de células jovens para a identificação definitiva.

A identificação de todos os isolados foi feita pelo método ACCUPROBE (Gen-Probe®), conforme instruções do fabricante.

3.3 - MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS

Após a identificação, os 99 isolados foram ressemeados em meio de cultura sólido de L-J até obter crescimento maduro. Após esse procedimento, foram mantidos a -20°C. Todas as subculturas para a extração do DNA foram feitas a partir das amostras congeladas.

3.4 - EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Uma parte do experimento foi realizada no Setor de Micobactérias da DPC/HC/UNICAMP. As etapas que exigiam descontaminação foram realizadas no Laboratório de Patogêneses Bacteriana e Biologia Molecular da FCM/UNICAMP.

O método utilizado foi o descrito por van SOOLINGEN et al. (1999). Após o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis* em meio sólido de L-J (30 dias ou 4 semanas), foram transferidas duas alças de cultura em 600µl de água destilada estéril em microtubos..

As amostras foram aquecidas por 20 minutos a 80°C, com a morte das micobactérias, em placa aquecedora, resfriadas em temperatura ambiente. O precipitado foi suspenso em 400µl de TE 1X (Tris/HCl 10mM; EDTA 10mM, pH 8,0) e transferido para microtubo de polietileno para microcentrífuga (1,5mL) e, a seguir, as células foram inativadas pelo calor por 20 minutos a 80°C. Foram adicionados 50µl de lisozima (10mg/mL) e incubado à 37°C por um período de 12 horas em aquecimento sob agitação (Thermomixer - Eppendorf®). Em seguida, foi adicionada uma solução contendo 70µl de Sodio-Duodecil-Sulfato (SDS) a 10% e 5µl de Proteinase K e agitado vigorosamente. A seguir, foram adicionados 100µl de solução de 10g% de Brometo de N-cetil-N,N,N-trimetil amônio (CTAB) e NaCl 4,1g% em água e pré - aquecida a 65°C, também agitado

vigorosamente até que o líquido adquirisse um aspecto branco leitoso, sendo depois aquecidos à 65°C sob agitação (Thermomixer Eppendorf®) por 10 minutos. Procedeu-se, então, à separação das proteínas, adicionando-se 750µl de solução 24:1 de clorofórmio/álcool isoamílico e centrifugação por 5 minutos a 12000 rpm. A fim de se precipitar o ácido nucléico, adicionou-se aos novos tubos 0,6 volumes (450µl) de isopropanol 100%. As amostras foram mantidas a -20°C por 24 horas e, a seguir, centrifugadas (12000 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado em 1000µl de etanol a 70%. Repetiu-se a centrifugação e o descarte do sobrenadante para a secagem do precipitado à temperatura ambiente. Por fim, os sedimentos foram ressuspensos em 30µl de tampão TE 1X pH8.0 (agente quelante com pH ideal para que não haja degradação do DNA) e estocados a -20°C, para uso posterior.

3.4.1 - Quantificação do DNA Extraído

O DNA extraído foi diluído na proporção de 1 para 100 e realizada a leitura em espectrofotômetro Gene - Quant II (Pharmacia Biotech®) nos comprimentos de onda λ 260 e λ 280. Foram utilizadas as soluções de DNAs com concentração entre 0,2µg/µl – 2,0µg/µL.

3.4.2 - Eletroforese do DNA Extraído

Para verificar a sua integridade, os DNAs extraídos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 0,7% acrescido de brometo de etídio (0,5µg/mL) para a sua visualização (SAMBROOK et al., 1989). Foi utilizado para a corrida eletroforética o tampão TBE (Tris 89mM/ Ácido Bórico 89mM/ EDTA 2, 5mM/ pH8,0) e submetidas as amostras a uma corrente de 100 V, por uma hora. Ao término da corrida, o gel foi fotografado em câmera Polaroid® com filme P & B 667 sob transiluminação ultravioleta (260nm).

3.5 - DIGESTÃO DO DNA GENÔMICO POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Os DNAs extraídos foram digeridos pela enzima de restrição *PvuII* (Life Technologies®). A digestão foi realizada num volume total de 20µL, nas seguintes condições: 2µL do tampão 10X da enzima; 4,5µg de DNA extraído; 1µL da enzima *PvuII* (10U/µL) e completado com água ultra-pura e estéril. Os tubos de polietileno foram agitados manualmente e centrifugados por 1 minuto (12.000 rpm) e incubados em banho-maria à 37°C por 4 horas. A seguir, foi adicionado 5µL de azul de bromofenol 10X, agitados manualmente e centrifugados por 1 minuto. A digestão completa dos DNAs foi observada por corrida eletroforética (utilizando-se 5µL do DNA digerido) em gel de agarose 0,8% com brometo de etídio (0,5µg/mL) corridos a 80V por 40 minutos em tampão TBE 1X. A seguir, os DNAs foram conservados à -20°C.

3.6 - ELETROFORESE

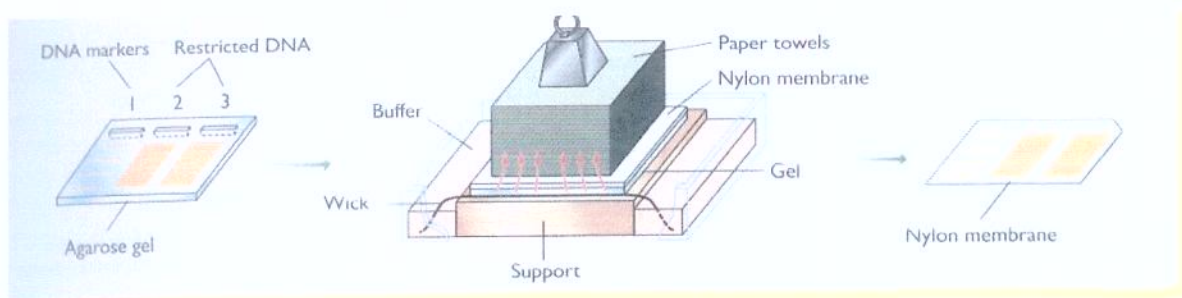
Os DNAs digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo (0,5µg/mL) para coloração e tampão de corrida TBE. As condições para a corrida eletroforética foram de 40V por 19-20 horas realizados em cuba eletroforética horizontal (Life Technologies®) no tamanho de 20x25cm. Os 20µL da digestão foram aplicados nas canaletas do gel e após a corrida eletroforética, o gel foi fotografado em câmera Polaroid com filme P & B 667 sob transiluminação ultravioleta (260nm).

3.7 - SOUTHERN BLOTTING

3.7.1 - Preparação do Gel para o Southern Blotting

Após a corrida eletroforética o gel foi submetido à luz UV até eliminação total do brometo de etídio e tratado com HCl 0,25M por 10 minutos para a depurinação dos fragmentos de DNA, a fim de aumentar a velocidade e eficiência da transferência. A seguir,

o gel foi lavado com água destilada estéril por 10 segundos e mergulhado em solução de NaOH 0,4M por 20 minutos, para a desnaturação da dupla fita de DNA. Na transferência utilizou-se membrana de nylon polarizada (Hybond N+/Amersham Pharmacia Biotech®), papel 3MM (Whatman®) e papéis de germinação de semente do mesmo tamanho do gel, que foram usados para na transferência do DNA. Depois desse período, novamente o gel foi lavado com água destilada estéril e solução de NaOH 0,4M por 20 minutos. O gel foi retirado da solução de desnaturação e montado o “sanduíche” para a transferência do DNA do gel para a membrana, conforme a seguir: num recipiente de vidro contendo solução nova de NaOH 0,4M foi colocado um suporte para o gel e estendido sobre esse uma tira de papel 3MM da mesma largura que o gel e comprimento suficiente para ficar submersa na solução salina, formando uma ponte. Sobre a ponte foram colocados 2 papéis 3MM umedecidos em solução NaOH 0,4M e o gel. Sobre o gel foi colocada a membrana umedecida em solução NaOH 0,4M e 1 folha de papel 3MM. Por último foram colocados várias folhas de papel de germinação de semente e sobre elas um vidro contendo um peso de aproximadamente 500g. Procedeu-se à transferência por 24 horas. Passado esse período o “sanduíche” foi desmontado e retirado a membrana de nylon. [Figura 7]



BROWN et al. (1999).

Figura 7 – Transferência do DNA do gel para a membrana de nylon por Southern Blotting

3.7.2 - Tratamento da Membrana depois do Southern Blotting

A membrana foi colocada com o DNA voltado para cima em papel saturado com solução de NaOH 0,4M por 2 minutos e lavada com solução SSC 5X não mais que 1 minuto. A seguir, o DNA foi fixado na membrana em UV a 200J (Crosslink-Hoefer®). A membrana foi usada diretamente na hibridização ou estocada a 4°C em saco plástico até o seu próximo uso.

3.7.3 - Construção da Sonda Molecular

3.7.3.1 - Amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A sonda foi obtida pela reação de PCR utilizando-se o DNA de *Mycobacterium bovis* BCG, que possui apenas uma cópia da IS6110. Foram utilizados dois oligonucleotídeos iniciadores (“primers”).

INS-1(5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC)

INS-2(5'-GCGTAGGCGTCGGTGCAA)

Esse par de iniciadores é responsável pela amplificação de um fragmento de DNA de 245 pares de bases, interno à sequência IS6110.

Foram utilizados os seguintes volumes/concentração de reagentes para um volume final de 50µL de reação: 100µL DNA alvo extraído (*M. tuberculosis*), tampão PCR 10X, 2,5mM dNTP, P1 (50ng/µL), P2 (50ng/µL), *Taq* polimerase (5U/µL), e água pura para adequar o volume final da reação.

Os tubos para microcentrífuga contendo a mistura completa foram introduzidos no termociclador para efetuar a amplificação, segundo as seguintes condições: 30 ciclos de 1 min a 96°C para a desnaturação, 1 min a 65°C para anelamento dos “primers”, e 2 min a 72°C para extensão da fita (síntese de DNA) e 6 min a 72°C de extensão final.

A amplificação foi visualizada por eletroforese em gel de agarose a 2% submetido a 50V por 2 horas, aplicando na primeira canaleta do gel 1µL do marcador de 100pb (Life Technologies®) e 1µL do azul de bromofenol 10X e nas demais canaletas 1µL do produto de DNA e 1µL do azul de bromofenol 10X.

A purificação foi realizada de acordo com o kit de purificação QIAquick (Qiagen®). Os fragmentos purificados foram quantificados por eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e nas canaletas foi adicionado o

DNA Quantification Standards (Life Technologies®) com concentrações padronizadas, assim, as amostras foram comparadas com esses padrões pela intensidade da luz emitida pelo brometo de etídio visualizadas em UV. Os produtos de PCR puros foram diluídos até a concentração de 10ng/μL e estocados à -20°C até seu uso .

3.7.4 - Marcação da Sonda

A marcação de 30μL (30ng) da sonda IS6110 obtida através de amplificação por PCR foi feita para uma reação de quimioluminescência, utilizando-se o Kit ECL- “direct nucleic acid labelling and detection systems” (Amersham Pharmacia Biotech®) e seguiu-se o protocolo sugerido pelo fabricante: diluiu-se a sonda obtida com água ultra pura, obtendo-se uma concentração de 10ng/μL e desnaturou-se a sonda com água em ebulição por 5 minutos e, a seguir, resfriada no gelo imediatamente por 1 minuto. Centrifugada brevemente a 12.000 rpm e, a seguir, adicionou-se um volume igual do reagente de marcação, agitada manualmente e adicionado um volume igual de glutaraldeído. A solução foi novamente centrifugada e incubada por 10 minutos a 37°C e usada para hibridização.

3.7.5 - Hibridização

A membrana de nylon foi enrolada sobre si mesma e colocada na garrafa de hibridização juntamente com 50mL do tampão ECL de hibridização (pré - aquecido) à 42°C por 1 hora. Nesse momento a sonda marcada foi adicionada diretamente à solução de hibridização dentro tubo e a membrana hibridizada por 24 horas a 42°C em forno de hibridização (Amersham Pharmacia Biotech®) sob rotação (6 rpm). Depois desse período o tampão de hibridização foi descartado e adicionou-se 50mL do tampão primário de lavagem (pré – aquecido) diretamente à garrafa de hibridização e manteve-se a mesma temperatura por 20 minutos. Após descartou-se o tampão de lavagem e repetiu-se a lavagem. A seguir, a membrana foi colocada numa bandeja de plástico com tampão

secundário de lavagem (SSC2X), até a membrana ficar submersa e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos sob agitação, o tampão foi descartado e repetiu-se esta etapa. Depois, a membrana foi retirada e seca à temperatura ambiente em papel 3MM.

3.7.6 - Detecção

Esta etapa foi realizada numa câmara escura, apenas na presença de luz vermelha. Para a detecção utilizou-se o Kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech®), contendo os reagentes de detecção 1 e 2. Misturou-se um volume igual de cada reagente de detecção. A membrana foi colocada numa bandeja de plástico e coberta com os reagentes. Retirou-se o excesso dos reagentes e colocou-se a membrana num saco plástico vedado. A membrana foi colocada com o DNA voltado para cima no cassete de Raio-X, expondo-a ao filme radiográfico (Hyperfilm - Kodak®) por 10-120 minutos, após esse período foi revelada em equipamentos apropriados no Setor de Raio-X do HC/UNICAMP. A membrana foi estocada em sacos plásticos à 4°C. [Figura 8]

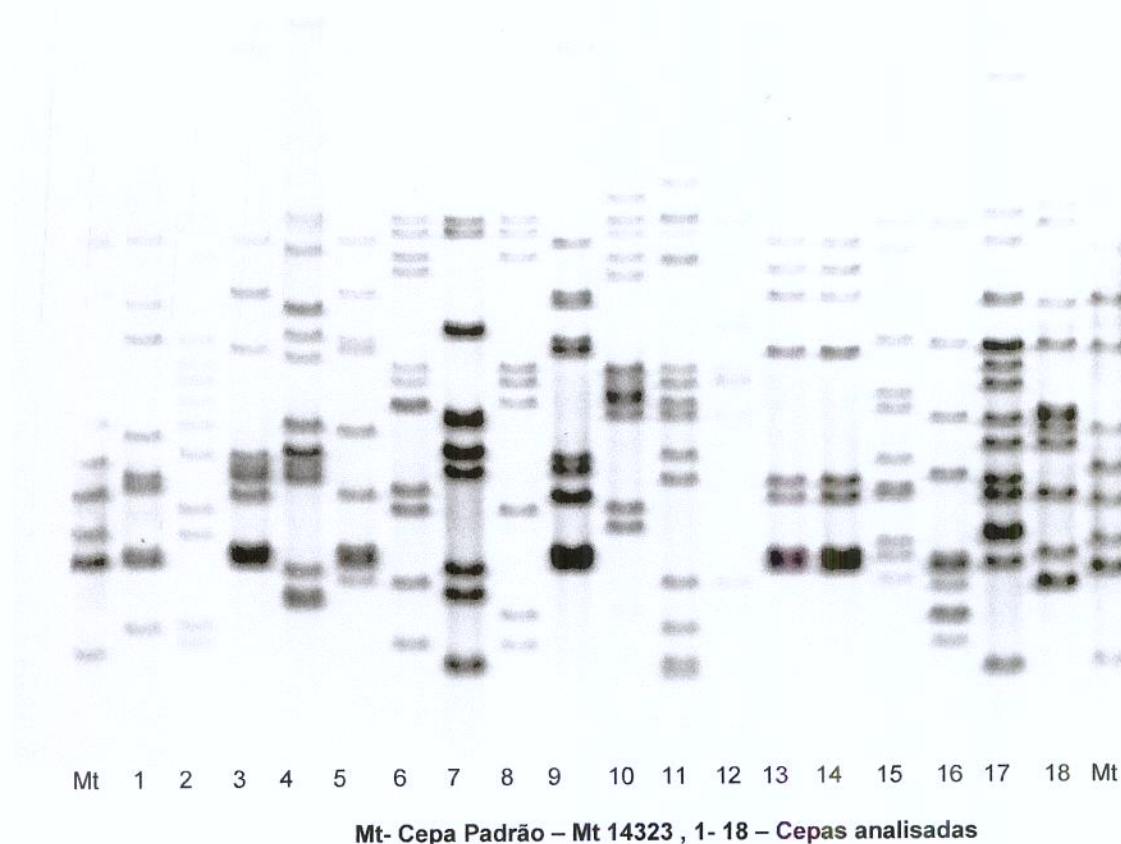


Figura 8 – Filme de raio X para analisar padrão de bandas

3.7.7 - Análise dos Resultados

Os isolados foram analisados pelo “software” *GelCompar II*, versão 2.5 (Applied Maths®, Kortrijk, Belgium), com padrão de similaridade maior que 98%.

3.8 - SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

3.8.1 - Reação de PCR para o SSCP

Para a amplificação foram utilizados dois pares de “primers” sintetizados com 157pb segundo TELENTI et al. (1993 a,b) e TELENTI et al. (1997):

TR8 (5'TGCACGTCGCGGACCTCCA)

TR9 (5'TCGCCGCGATCAAGGAGT)

Foi amplificado por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) em 40 ciclos de 1 min. a 94°C (desnaturação), 1 min. a 55°C (anelamento) e 1 min. a 72°C (extensão), com uma extensão final de 10 min. a 72°C.

Para a reação da PCR (50µL) contendo 1ng DNA genômico, 50 mM KCl, 10 mM Tris(pH 8.0), 2,5 mM MgCl₂, 100µM de dNTPs, 1U Taq polymerase, 10 p mole de cada primer e 10 ng do DNA.

Os fragmentos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídeo e verificada a presença da banda marcada na posição de 157pb. [Figura 9]

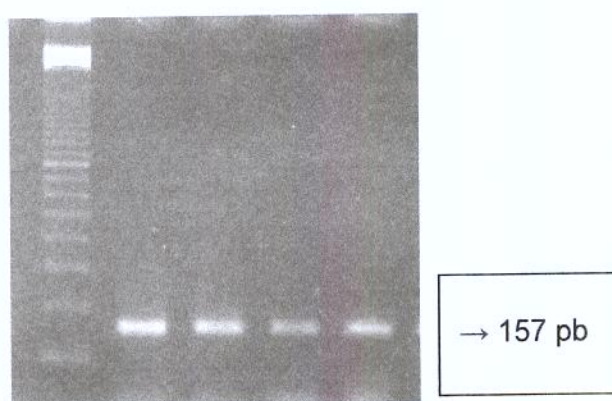


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose corado por Brometo de Etídeo

3.8.2 – Aplicação das amostras de SSCP

Cerca de 3µL das amostras de DNA amplificadas por PCR foram diluídas em 3µL de tampão da amostra (formamida, solução de xileno cianol, solução de azul de bromofenol). [Figura 10]

Antes de ser aplicada no gel de poliacrilamida, as amostras sofrem uma desnaturação de 5 min a 95°C e imediatamente foram resfriadas no gelo.

Foram analisadas 65 amostras de *M.tuberculosis* resistentes à rifampicina e 13 amostras sensíveis. Utilizou-se o aparelho GenePhor (Amersham Pharmacia Biotech®) com o Kit – GeneGel SSCP (Amersham Pharmacia Biotech®).

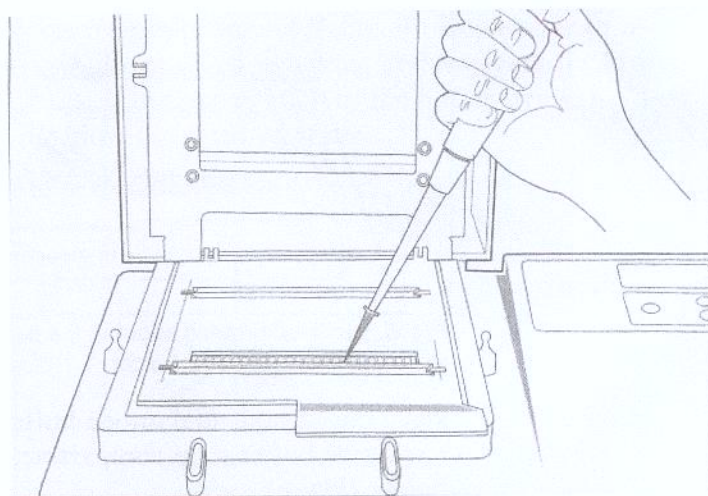


Figura 10 – Aplicação das amostras em gel de poliacrilamida no aparelho GenePhor®

As condições para a eletroforese no gel de poliacrilamida foram previamente analisadas quanto a temperatura e pH do tampão, foram escolhidas como melhores opções a temperatura de 5°C e tampão com pH 9.0.[Quadro 2]

Quadro 2 – Condições para eletroforese em gel poliacrilamida do SSCP

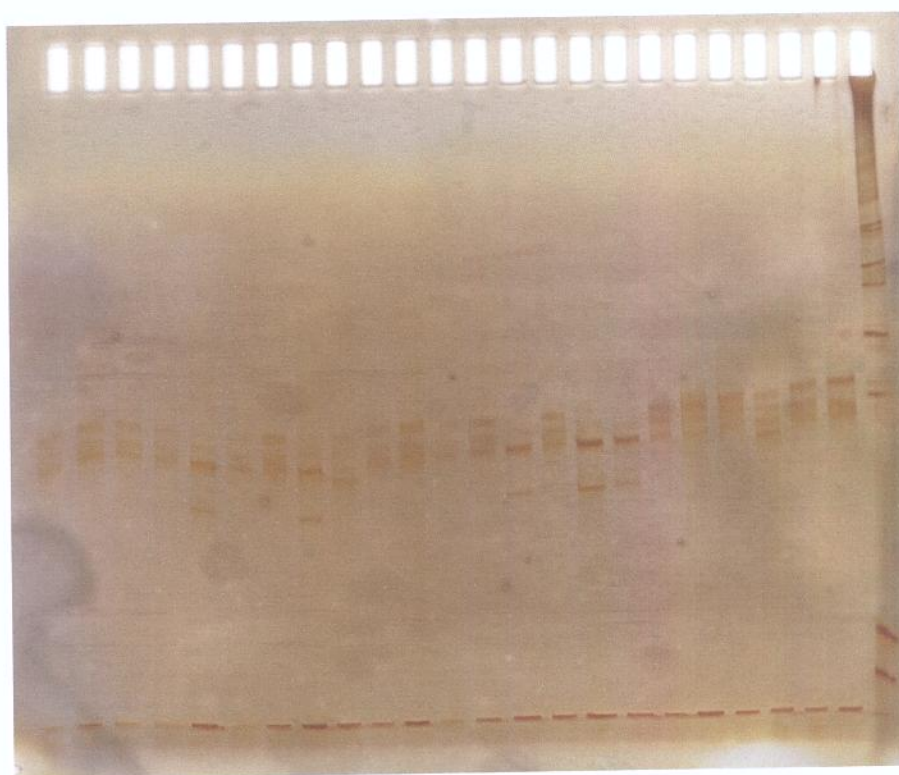
	Temperatura	Voltagem	Corrente	Potência	Tempo
Fase 1	5°C	90V	6mA	5W	25 min
Fase 2	5°C	500V	14mA	10W	90 min

3.8.3 – Detecção

A detecção foi feita pela coloração por prata, Figura 11, com 6 etapas:

- A fixação, com uma solução de Ácido Sulfônico-Benzeno diluído em Etanol por 40 min;
- A 1ª lavagem – Água destilada 3x de 10min;
- A coloração pela Prata, solução de AgNO_3 e Ácido Sulfônico-Benzeno;

- A 2ª lavagem com água destilada por 2 min;
- A revelação com uma solução de Na_2CO_3 , formaldeído e Tiosulfato de sódio por 7 min e
- A Solução “Stop” com Ácido acético, acetato de sódio e glicerol por 20 min.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 M

Canaletas de 1 a 23 – Cepas Analisadas, M – Marcador utilizado em SSCP

Figura 11 – Gel de poliacrilamida comparando cepa sensível (sem mutação) com as demais cepas (possivelmente mutantes)

3.8.4 – Análise de Resultados

A análise de resultados dos géis de poliacrilamida foi realizada visualmente, comparando-se o padrão das bandas das cepas padrão (Mtb 14323 e as sensíveis) com as demais cepas, analisadas em cada gel.

3.9 - SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento automático baseia-se no mesmo princípio que o manual, porém são utilizados fluoróforos para a marcação das bases, que serão lidas posteriormente por um seqüenciador, aparelho com fotomultiplicador que detecta a luz emitida pelos fluorocromos excitados e os registra através de um eletroferograma (Adams e cols, 1994). Este seria o método ideal para a análise de mutações devido à simplicidade, rapidez e precisão, porém a sensibilidade na detecção de uma simples mutação de ponto ainda deixa a desejar, particularmente em genes ricos em G-C, como os da globina α . Além disso, o seqüenciador é ainda um equipamento de custo elevado para grande parte dos laboratórios (KELLER & MANAK, 1993).

3.9.1 – Sequenciamento automático para detecção das bases mutantes

Foram sequenciadas 34 amostras. A amplificação para sequenciamento automático foi realizada com o *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA). Para esta reação utilizou-se 10 ng do produto de PCR purificado, 1,6 pmol de iniciador sense e anti-sense (em reações separadas), 1,5 μ L da solução *Terminator Ready Reaction Mix* do *BigDye* e água destilada estéril (volume final 10 μ L). A reação, distribuída em placa própria para sequenciamento, foi protegida da luz com papel de alumínio. Em termociclador automático (GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems) as amostras foram submetidas a desnaturação inicial (96°C/1 minuto) e 30 ciclos, com as seguintes temperaturas e tempos:

1. desnaturação a 96°C/10 segundos
2. anelamento a 57°C/5 segundos
3. extensão a 60°C/4 minutos

O produto desta nova reação de PCR foi então submetido à purificação: 2µL de acetato de amônio 7,5M e 50µL de etanol absoluto foram adicionados aos 10 µL da reação, com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e a seguir adicionou-se 100µL de etanol 70%. Posteriormente o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão tomando-se o cuidado de não remover o DNA contido no fundo do microtubo. Para a completa remoção do etanol, a placa foi submetida à centrifugação invertida a 200 rpm por 7 segundos e finalmente aquecida em termobloco a 65°C por 5 minutos para a secagem dos poços. O produto da purificação foi armazenado a -20°C, protegido da luz com papel alumínio até a eletroforese. Para a eletroforese, adicionou-se 2,0µL de loading buffer, uma mistura de formamida deionizada (Invitrogen), 25mM EDTA (pH 8,0) com azul dextran (50mg/mL) na proporção de 5:1 em cada poço. As amostras foram homogeneizadas, desnaturadas a 95°C por 5 minutos e colocadas em gelo para, a seguir, serem aplicadas em gel de poliacrilamida 2mm de espessura e separados por eletroforese em sequenciador automático (*ABI Prism 377 DNA Sequencer*, Perkin Elmer®, Norwalk, CT, USA), gentilmente cedido pelo Laboratório do Hemocentro/FCM/UNICAMP.

O gel para 100mL é composto por 4,5% de acrilamida/bis-acrilamida (19:1, volume final 10mL), 36g de uréia, 1g de resina Dowex, 10 tampão TBE 10X (108g de Tris, 55g de ácido bórico e 8,3g de EDTA dissódico, volume para 1000mL). Desta solução, utiliza-se 20mL para a montagem da placa adicionando-se 130µL de persulfato de amônio (100 mg/mL) e 13µL de TEMED. Após 2 horas de polimerização, a placa é limpa e colocada em cassete para a eletroforese.

As condições de eletroforese foram: Voltagem → 1680 KV, Corrente → 50.0 mA, Potência → 150 W, Temperatura do gel → 50°C, Potência do laser → 40.0 mW, Tempo de corrida → cerca de 3 horas.

3.9.2.– Análise de Resultados

Para analisar as 34 cepas resistentes à rifampicina, foram sequenciadas as fitas “sense” e “anti-sense” e o produto do sequenciamento automático foi analisado pelo “software” *Chromas* versão 2.22 – (Technelysium Pty. Ltd. ®). [Figura 12]

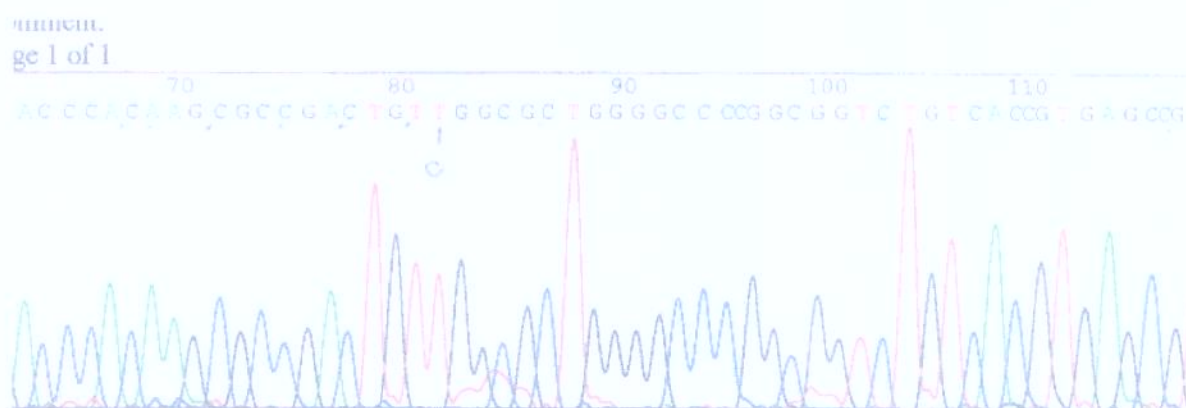


Figura 12 – Sequenciamento automático analisado pelo *Chromas*®



4 - RESULTADOS

4.1 - RFLP

Das 99 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* foram excluídas 21 (9 quando ressemeadas para a manutenção não apresentaram crescimento em meio sólido de L-J e 12 não foram reveladas durante a genotipagem). Portanto foram analisadas 78 cepas utilizando a técnica de RFLP com a enzima de restrição IS6110 [65 cepas resistentes a rifampicina (RIFr) e 13 cepas sensíveis (RIFs)].

Foram encontrados 3 “clusters”, cada um com dois isolados. Desses apenas um cluster foi seqüenciado, portanto todas as cepas seqüenciadas não estão relacionadas do ponto de vista epidemiológico. A análise de todas as cepas foi feita pelo programa computacional GelCompar II, versão 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) . [Anexo 5]

4.2 - SSCP

As 78 cepas analisadas, 65 RIFr e 13 RIFs, foram distribuídas em 19 grupos obtidos de 5 géis eletroforéticos. Selecionou-se randomicamente de 30% a 50% das cepas de cada grupo e estas foram seqüenciadas. [Quadro 3]

Quadro 3 – Relacionando número das cepas, data de isolamento da cepa, a suscetibilidade, padrão do SSCP e número do gel SSCP, a análise dos clusters e as mutações presentes por sequenciamento.

	Nº cepa	data de isolamento	sexo	Resistência	procedência	Padrão sscp	gel sscp	RFLP	mutação	
HC	2323			SENS	CAMPINAS	A	1,5		S/MUT	
	10	01210	05/2000	M	I	MC	A	1	✓	S/MUT
	19	00702	03/2000	F	I/S	ITAPECIRICA	A	1	✓	S/MUT
	33	00364	02/2000	M	I	SP	A	1	✓	S/MUT
	37	00213	02/2000	M	I	SP	A	1	✓	S/MUT
	40	00425	02/2000	M	I	SANTOS	A	1	✓	S/MUT
	49	00553	03/2000	M	I	OSASCO	A	1	✓	S/MUT
	51	01210	05/2000	M	I	MC	A	1	a	S/MUT

HC	1023				SENS		A	1,3,4		S/MUT
HC	3383				SENS		I	2,3		S/MUT
	4	00044	01/2000	M	I	SP	B	1	✓	S/MUT
HC	102			M	I	CAMPINAS	B	1	✓	S/MUT
	25a	92506	08/1999	F	I/R/P	SP	C	1	b	H526D
	28	01438	04/2000	F	I/R	SP	D	1	✓	H526D
	30	00052	01/2000	F	I	SP	E	1	✓	S/MUT
	3	00724	03/2000	M	I	ITAPECIRICA	F	2	c	S531L
	8	00006	01/2000	M	I	SANTOS	F	2	✓	S531L
	15	00597	03/2000	M	I/R/P/E	SP	F	2	✓	S531L
	21	93843	01/2000	M	I	SP	F	2	✓	S521L
	46	2248	07/2000	M	I/R	MS	F	2	b	S531L
	53	01285	05/2000	F	I/R/E	CAMPINAS	F	2	✓	S531L
	57	3076	08/2000	M	I/R	MC	F	2	✓	S531L
	63	2810	08/2000	M	I/R	CAMPINAS	F	2	d	D516V
	73	2626	08/2000	M	I/R	SP	F	2	✓	S531L
	84	2324	07/2000	M	I/R/P	MC	F	2	g	S531L
	87	2431	08/2000	M	I/R/P	SP	F	2	✓	S531L
HC	101			M	I/R	CAMPINAS	F	2	✓	S531L
HC	103			M	I/R/P	CAMPINAS	F	2	f	S531L
HC	104			F	SENS	CAMPINAS	F	2	✓	S531L
	39a	92506	08/1999	F	I/R/P	SP	G	2	✓	H526D
	55	00482	02/2000	F	I	SP	G	2	✓	H526D
	N°	data de	sexo	Resistência	procedência	Padrão	gel	RFLP	mutação	
	cepa	isolamento				sscp	sscp			
	56			R	SP	G	2	f	H526D	
HC	106			M	I/S	CAMPINAS	G	2	✓	H526D
	59	3089	08/2000	M	I/R/P	SANTOS	H	2	✓	S531L
	83	2316	09/2000	M	I/R	MC	H	2	✓	S531L
HC	1200				SENS	CAMPINAS	I	3,4	✓	S/MUT
	12	92433	08/1999	F	I/R	CAMPINAS	J	3	✓	H526D
	16	01237	05/2000	F	I	TAUBATÉ	J	3	✓	H526D
	27 *	01194	05/2000	F	I/R	SANTOS	J	3	✓	H526D

Resultados

	60	2937	08/2000	M	I/R	MC	J	3	✓	H526D
	86	2518	08/2000	M	I/R	SP	J	3	✓	H526D
	17	94018	01/2000	F	I	SP	K	3	✓	S531L
	22	00582	03/2000	M	I/R/E	SP	K	3	✓	S531L
	36	91242	05/1999	F	I/R	SP	K	3	✓	S531L
	41				I/R/P	SP	K	3	✓	S531L
	42	2627	08/2000	M	I/R	SP	K	3	✓	S531L
	48	00130	02/2000	M	I/R	SJC	K	3	✓	S531L
	58				I/R		K	3	h	S531L
	61	2842	08/2000	M	I/R	SP	K	3	h	S531L
	68	2730	08/2000	M	I/R/P	SP	K	3		S531L
	72	2763	08/2000	M	I/R	SANTOS	K	3	✓	S531L
	77	2406	08/2000	F	I/R	SANTOS	K	3	✓	S531L
	80	2266	08/2000	M	I/R/P/E	SP	K	3		S531L
	88	2341	08/2000	M	I/R/P	SP	K	3	✓	S531L
	18	93898	02/2000	M	I/R/P/E	OSASCO	L	4	✓	S531L
	23	00183			SENS		L	4	✓	S531L
	24	01195	05/2000	M	I/R/P/E	SANTOS	L	3	✓	S531L
	31	01250	05/2000	F	I/R	SP	L	4	✓	S531L
	34	00489	02/2000	M	I	SP	L	4	✓	S531L
	35	92507	08/1999	F	I/R/P	SP	L	4	✓	S531L
	38	92508	08/1999	F	I/R/P	SP	L	3	✓	S531L
	67	2365	07/2000	M	I/R	SP	L	4	✓	S531L
	70	2371	07/2000	M	I/R	SP	L	4	✓	S531L
	81	2295	07/2000	M	I/R/P/E	SP	L	4	✓	S531L
	89	2325	07/2000	M	I/R/P/S	MC	L	4	✓	L533P
HC	90				I		L	4	e	S531L
	7*				I/R		M	4	✓	H526D
	20	00018	01/2000	M	I/R	SP	N	4	✓	INS
	66	2808	08/2000	F	I/R/P	CAMPINAS	O	4	✓	H526D
	74	2637	08/2000	M	I/R	SP	P	5	✓	H526Y
	14	01243	05/2000	M	I/R	SP	Q	5	✓	H526D

Resultados

71	2715	08/2000	M	I/R/P	RIB. PRETO	Q	5	✓	H526D
11	00585	02/2000	M	I/R/P/S	SP	R	5	✓	S531L
32	92973	10/1999	F	I/R	SP	R	5	✓	S531L
105			M	I/R/P	CAMPINAS	R	5	✓	S531L
76	2846	08/2000	M	I/R/P	SP	R	5	✓	S531L
47				R		R	5		S531L
85				R		S	5		S531L

* mesma cepa enviada duas vezes (7, 27 a – mesmo paciente, amostras diferentes padrão RFLP, clusters B;F e H.

4.3 - SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO

Segundo a seleção randômica do SSCP, foram selecionadas 34 cepas para a análise de sequenciamento das bases. As cepas eram compostas de 25 RIFr e 9RIFs conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição das cepas conforme as mutações encontradas relacionadas com o padrão de suscetibilidade as drogas de primeira linha para o tratamento da Tuberculose.

Codon/Mutação	Resistência a								Não Resistente	
	I	R	I/R	I/R/E	I/R/P	I/R/P/E	I/S	I/R/P/S		Total (%)
S531L			7	1	5	2				15 (44%)
H526D		1	2		3					6 (18%)
H526Y			1							1 (3%)
L533P								1		1 (3%)
D516V			1							1 (3%)
Ins Phe ₅₁₄ , Met ₅₁₅			1							1 (3%)
Sem mutação	4						1		4	9 (25%)
Total	4	1	12	1	8	2	1	1	4	34

I- Isoniazida; R- Rifampicina; P – Pirazinamida; E- Ethambutol; S- Estreptomicina.

Foram encontradas 9 (25%) cepas sem mutação todas eram sensíveis a Rifampicina. Das cepas Resistentes a Rifampicina, segundo a substituição dos amino ácidos foram encontradas: Ser₅₃₁ (44%), His₅₂₆ (21%), Leu₅₃₃ (3%), Asp₅₁₆ (3%) e uma inserção de dois códon Phe₅₁₄, Met₅₁₅ (3%).

A mutação no códon 531 pode ser visualizada comparando o seu sequenciamento e o de um isolado sem mutação.[Figura 13a e Figura 13b]

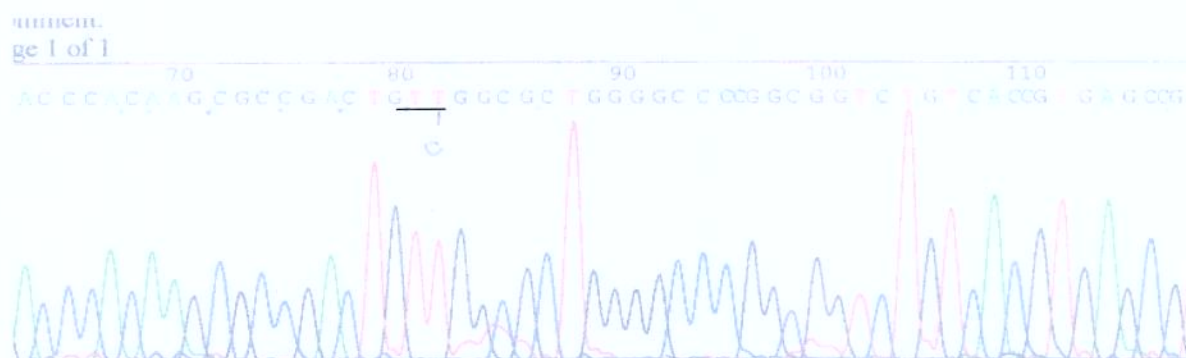


Figura 13a – Mutação no Códon 531 TCG→TTG (Serina – Leucina)

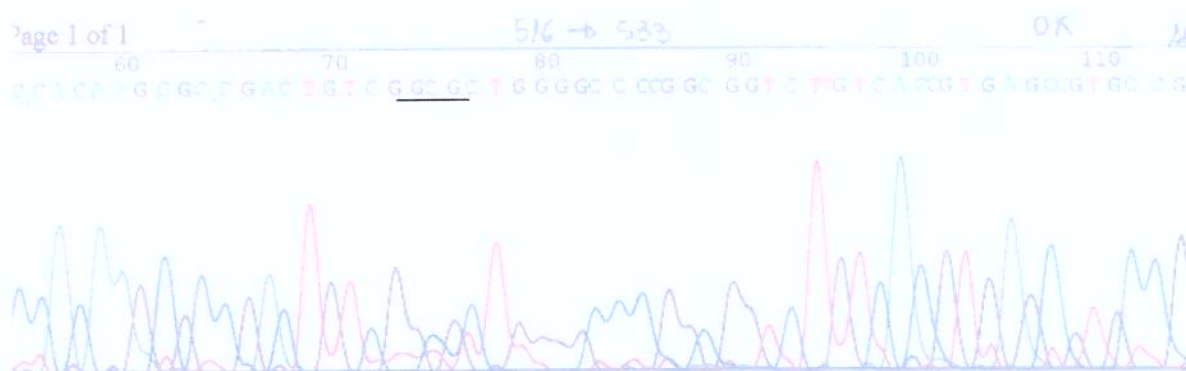


Figura 13 b – Isolado sem mutação

Resultados

A inserção encontrada em um dos isolados, pode ser visualizada comparando-a ao sequenciamento da cepa sem mutação. [Figura 15a e Figura 15b]

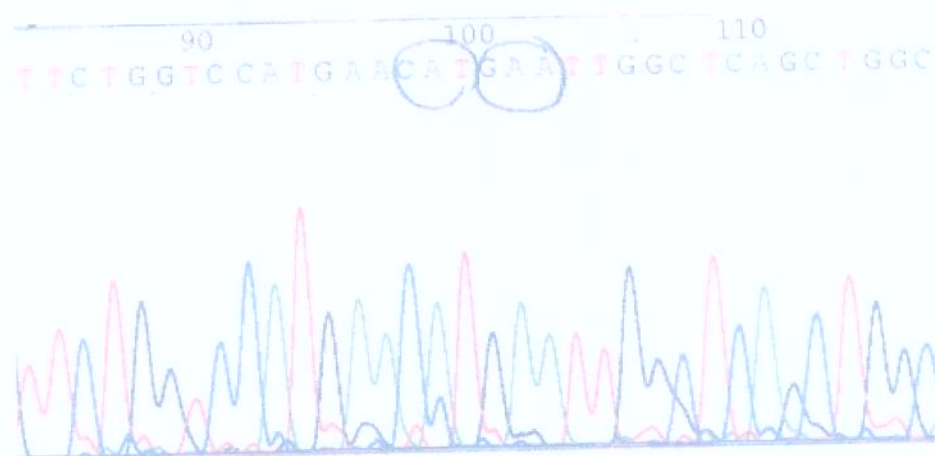


Figura 15a – Inserção Phe₅₁₄, Met₅₁₅

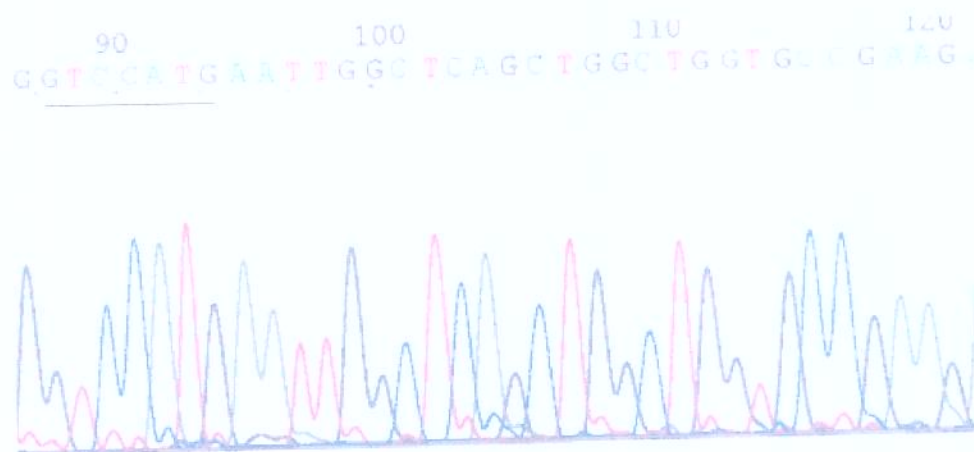


Figura 15b – Isolado sem mutação.



5 - DISCUSSÃO

Uma ferramenta da microbiologia que auxilia as investigações epidemiológicas é a aplicação de técnicas moleculares (MASLOW et al, 1993). Neste trabalho, foi utilizada a genotipagem pela técnica do RFLP em 78 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Dos elementos de inserção descritos, foi escolhida a IS6110, que é a de melhor padronização e a mais utilizada por apresentar maior número de cópias no genoma de *M. tuberculosis* (THIERRY et al, 1990; van EMBDEM et al, 1993 e van SOOLINGEN et al, 1999).

Foram encontrados 3 agrupamentos com 2 isolados em cada grupo, com índice de similaridade maior que 98%. As demais 72 cepas são pleomórficas com índice de similaridade entre 30% e 80%.

O controle da Tuberculose tem sido uma preocupação mundial, pois a incidência das cepas resistentes as drogas de primeira linha tem aumentado (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2000). Portanto fazem-se necessários estudos sobre os mecanismos de resistência utilizados pelo *Mycobacterium tuberculosis*. A rifampicina é o componente chave para o tratamento da tuberculose. Os *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a rifampicina utilizam uma estratégia comum de mutação em uma região do gene *rpoB* com 69pb e é denominada região determinadora de resistência a rifampicina. Essa região é responsável por mais de 95% das mutações que ocorrem em cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina (GONZALEZ et al, 1999). Quando o amino ácido codificado for alterado pela substituição de uma única base ocorrem mudanças conformacionais da proteína que não são detectadas pela droga TELLES et al.(2002).

Segundo Cooksey et al. (2000) as cepas de MTB resistentes a rifampicina são resistentes a isoniazida em uma probabilidade maior que 50%. Então estudando-se os mecanismos de resistência das micobactérias a rifampicina estaríamos em grande parte estudando as MTB multirresistentes. As mutações no gene *rpoB* estão sendo muito estudadas e associadas as cepas resistentes a rifampicina (GONZALEZ et al, 1999 e MIKHAILOVICH ET AL, 2001).

Para estudar as mutações no gene *rpoB* de MTB resistentes a rifampicina, foram escolhidas as técnicas do SSCP e sequenciamento indicadas nos estudos de Telenti et al. (1993) e Mikhailovich et al. (2001). A técnica do SSCP foi escolhida após estudos dos

métodos genotípicos disponíveis (KELLER & MANAK, 1993). O fragmento do gene estudado é pequeno (157pb) e estudos mostram que a sensibilidade do SSCP é de maior que 95% para fragmentos entre 100pb e 300pb. O SSCP é utilizado para fazer triagem das mutações, posteriormente confirmadas por sequenciamento (FELMLEE et al, 1995; SCARPELINI et al, 1997; SELVAKUMAR et al, 1997 e BODADILLA-DEL-VALLE et al, 2001). Em nosso trabalho optamos por estas técnicas por estarem bem padronizadas e por serem as mais utilizadas. Porém, os géis de poliacrilamida do SSCP não apresentaram boa resolução, o que apresentou uma margem de erro já que os géis foram analisados visualmente. Foram caracterizados 19 grupos e desses randomicamente foram separados de 30% a 50% das cepas para serem seqüenciadas. O método do SSCP não pode ser analisados quanto a sensibilidade e quanto a especificidade.

O sequenciamento do DNA é a maneira mais eficiente de caracterizar uma mutação de um único nucleotídeo (KELLER & MANAK, 1993). Em nosso estudo analisamos pelo sequenciamento 34 cepas escolhidas randomicamente dos 19 grupos dos géis de SSCP. Todas as cepas seqüenciadas foram comparadas com o genoma do *Mycobacterium tuberculosis* e as mutações foram detectadas com facilidade e precisão. Apesar do sequenciamento das bases ficar mais difícil em genes ricos em G-C, como o gene *rpoB*, todas as cepas foram analisadas de maneira simples e rápida.

A mutação no códon 531 relatada com maior freqüência em trabalhos que estudaram cepas de MTB resistentes a rifampicina, em nosso estudo foi a mutação de maior prevalência (44%). As cepas estudadas no Brasil, VALIM et al. (2000) e SPINDOLA DE MIRANDA et al. (2001), coletadas de 3 estados federativos, mostram esta mutação como a mais freqüente em 56.2%, e 50% dos isolados estudados. Outras investigações de diferentes países citam a mutação no códon 531 como mais freqüente envolvendo cepas resistentes a rifampicina. MANI et al. (2001) observou esta mutação em 53% dos isolados resistentes a rifampicina da Índia. Já no México, BODADILLA-del-VALLE et al. (2001) encontrou 40% de cepas resistentes a rifampicina com esta mutação. Uma grande quantidade de trabalhos desenvolvidos mundialmente tem encontrado a mutação no códon 531 seguida do códon 526 como as mais prevalentes. RAMASWANNI & MUSSER (1998) estudaram cepas de *M. tuberculosis* procedentes de várias partes do mundo e encontraram

estas mutações nas frequências de 41% e 36% respectivamente. O códon 526 encontrado como o local de segunda maior prevalência neste trabalho (19%) também é citado pelos outros estudos de VALIM et al. (2000) e SPINDOLA DE MIRANDA et al. (2001).

Uma mutação complexa correspondente a uma inserção de dois códons por repetição, Phe₅₁₄ e Met₅₁₅, foi encontrada no nosso estudo e também foi descrita por KAPUR et al. (1994) trabalho realizado com cepas do surto nosocomial em Nova York.

Em estudo multicêntrico, inclusive com participação brasileira, demonstrou-se que as cepas resistentes a rifampicina, utilizam a estratégia de mutação na região da beta subunidade da polimerase do gene *rpoB*. Foram estudadas técnicas de identificação mais rápidas como PCR e um teste rápido que aplicados as cepas determinam com rapidez a resistência a rifampicina, como o usado por OLIVEIRA et al. (2003). Este método, sendo oneroso, dificilmente terá aceitabilidade em rotina de laboratórios clínicos.



6 - CONCLUSÕES

1. Foram encontrados neste estudo três agrupamentos com 2 isolados em cada grupo.
2. Foi encontrada relação entre a resistência a rifampicina e as mutações que ocorrem no gene *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*, as mutações foram detectadas por SSCP e confirmadas pelo sequenciamento automático. A mutação de maior prevalência foi a mutação no códon 531(44%), seguida do códon 526 (19%). Foi encontrada também uma inserção de dois códons por repetição, Phe₅₁₄ e Met₅₁₅, apenas descrita uma única vez.



7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. S.; KERLAVAGE, A. R.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; FIELDS, C.; FRASER, C. M.; VENTER, J.C. A model for high-throughput automated DNA sequencing and analysis facilities. **Nature**, **368**(6470): 474-5, 1994.

AGERTON, T.B.; VALWAY, S.E.; GORE, B.; PORZSIK, C.; BLINKHORN, R.J.; PLIKAYTIS, B.; WOODLEY, C.; ONORATO, I. Transmission of a Highly Drug-Resistant Strain (Strain W1) of *Mycobacterium tuberculosis*. **JAMA**, **278**: 1073-7, 1997.

AGERTON, T.B.; VALWAY, S.E.; BLINKHORN, R.J.; SHILKRET, K.L.; REVES, R.; SCHLUTER, W.W.; GORE, B.; POZSIK, C.J.; PLIKAYTIS, B.B.; WOODLEY, C.; ONORATO, I.M. SPREAD OF STRAIN W. A highly drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*, across the United States. **Clin. Infect. Dis.**, **29**: 85-92, 1999.

AHMAD, S.; MOKADDAS, E.; FARES, E. Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait and Dubai. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **44**: 245-52, 2002.

ALLAND, D.; KALKUT, G. E.; MOSS, A. R.; MCADAM, R. A.; HAHN, J. A.; BOSWORTH, W.; DRUCKER, E.; BLOOM, B. R. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. **N. Engl. J. Med.**, **330**: 1710-6, 1994.

BAHRMAND, A. R.; MARASHI, S. M.; BAKAYEVA, T. G.; BAKAYEV, V. V. Chemical cleavage of mismatches in heteroduplexes of the rpoB gene for detection of mutations associated with resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin. **Scand. J. Infect. Dis.**, **32**: 395-8, 2000.

BIFANI, P.J.; PLIKAYTIS, B.B.; KAPUR, V.; STOCKBAUER, K.; PAN, X.; LUTFEY, M.I.; MOGHAZEH, S.L.; EISNER, W.; DANIEL, T.M.; KAPLAN, M.H.; CRAWFORD, J.T.; MUSSER, J.M.; KREISWIRTH, B.N. Origin and interstate of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. **JAMA**, **275**: 452-7, 1996.

BIFANI, P. J.; MATHEMA, B.; LUI, Z.; MOGHAZEH, S. L.; SHOPSIN, B.; TEMPALSKI, B.; DRISCOLL, J.; FROTHINGHAM, R.; MUSSER, J. M.; ALCADES, P.; KREISWIRTH, B. N. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. **JAMA**. **282**: 2321-7, 1999.

BIFANI, P. J.; MATHEMA, B.; KUREPINA, N. E.; KREISWIRTH, B. N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. **Trends in Microbiology**. **10**: 45-52, 2002.

BOBADILLA-DEL-VALLE, M., A. PONCE-DE-LEON, C. ARENAS-HUERTERO, G.VARGAS-ALARCON, M. KATO-MAEDA, P.M. SMALL, P.COUDRY, G. RUIZ-PALACIOS, AND J. SIFUENTES-OSORNIO. *rpoB* Gene Mutations in Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Identified by Polymerase Chain Reaction Single-Stranded Conformation Polymorphism. **Emer. Infect. Dis.**, **7**: 1010-1013, 2001.

BODMER, T.; ZURCHER, G.; IMBODEN, P.; TELENTI, A. Mutation position and type of substitution in the β -subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Antimicrob. Chemot.**, **35**: 245-8, 1995.

BRAGA, J. U.; BARRETO, A. M.; HIJAR, M. A. Inquérito epidemiológico da resistência as drogas usadas no tratamento da Tuberculose. BR: Relatório Final. RJ: CRPHF/FUNASA, 1999.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N.; JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. Microbiologia Médica. Guanabara, 20ª ed. 206-13, 1998.

BROWN, T. A. Genomes. **Bios Scientific Publishers**. 19, 60-82, 331-347, 1999.

CALUSNI, A.L.R.; ROSCANI, G.; VILLARES, M.C.B.; SOINI, H.; GRAVISS, E. A.; RAMOS, M. C. IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Campinas, Brazil. Evidence of Intercontinental Distribution of Strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **98**(5): 655-8, 2003.

CANETTI, G.; RIST, N.; GROSSET, J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la methode des proportions: methodologie, criteries de résistance, resultants, interpretations. **Revue de la Tuberculose et de Pneumologie**, **27**: 217-72, 1963.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Reports on chronic diseases: tuberculosis.2002

CINGOLANI, A.; ANTINORI, A.; SANQUINETTI, M.; GILLINI, L.; DE LUCA, A.; POSTERARO, B.; ARDITO, F.; FADDA, G.; ORTONA, L. Application of molecular methods for detection and transmission analysis of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in patients attending a reference hospital in Italy. **J.Infect.Dis.**, **179**: 1025-9, 1999.

COCKERILL III, F.R.; UHL, J.R.; TEMESGEN, Z.; ZHANG, Y.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G.D.; WILLIAMS, D.L.; KLINE, B.C. Rapid Identification of a Point Mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (kat) Gene Associated with Isoniazid Resistance. **J.Inf.Dis.**, **171**: 240-5, 1995.

COHN, D.; BUSTREO, F.; RAVIOGLIONE, R.D.. Drug resistance in tuberculosis: review of the world-wide situation and WHO/IAUTLD global surveillance project. **Clin. Infect. Dis.** **24** (Suppl 1): 121-130, 1997.

COLE, S.T.; BROSH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C.E. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, **393**: 537-544, 1998.

COLLINS, C. H. ; GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Organization and Practice in Tuberculosis Bacteriology. **Butterworths**. 125p. 1985.

CONSENSO BRASILEIRO DE TUBERCULOSE, I. **J. Pneumol.** **23**(6): 329-331, 1997.

COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G. P.; McQUEEN, A.; GLICKMAN, S. E.; CRAWFORD, J. T. Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, **40**: 1186-8, 1996.

COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G. P.; GLICKMAN, S.; CRAWFORD, J. T.; Evaluation of a line probe assay kit for characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. **J.Clin.Microbiol.**, **35**: 1281-3, 1997.

COOKSEY, R.C.; HALLOWAY, B.P.; OLDENBURG, M.C.; LISTENBEE, S.; MILLER, C.W. Evaluation of the Invader Assay, a Linear Signal Amplification Method, for Identification of Mutations Associated with Resistance to Rifampin and Isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **44**: 1296-1301, 2000.

DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S.; BARRY WOOD, W. JR. Microbiologia, 3º v. Infecções Bacteriana e Micóticas. **Edart-São Paulo Livraria e Editora Ltda.** 239-63, 1973.

DYE, C.; ESPINAL, M. A.; WATT, C. J.; MBIAGA, C.; WILLIAMS, B. G. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. **J. Infect. Dis.** **185**: 1197-1202, 2002

DROBNIEWSKI, F.A. & WILSON, S.M. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* – a molecular story. **J. Med. Microbiol.**, **47**: 189-96, 1998.

EDWARDS, K. J.; METHERELL, L. A.; YATES, M.; SAUNDERS, N. A. Detection of *rpoB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* by biprobe analysis. **J. Clin. Microbiol.**, **39**: 3350-2, 2001.

FANG, Z.; MORRISON, N.; WATT, B.; DOING, C.; FORBES, K. J. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. **J. Bacteriol.**, **180**: 2102-09, 1998.

FELMLEE, T.A.; LUI, Q.; WHELEN, A.C.; WILLIAMS, D.; SOMMER, S.S.; PERSING, D.H. Genotypic Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Rifampin Resistance: Comparison of Single-Strand Conformation Polymorphism and Dideoxy Fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 1617-23, 1995.

FINKEN, M.; KIRSCHNER, P.; MEIER, A.; WREDE, A.; BÖTTGER, E. C. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. **Mol. Microbiol.**, **9**: 1239-46, 1993.

FRIEDEN, T.R.; SHERMAN, L.F.; MAW, K.L.; FUJIWARA, P.I.; CRAWFORD, J.T.; NIVIN, B.; SHARP, V.; HEWLETT, D.Jr.; BRUDNEY, K.; ALLAND, D.; KREISWORTH, B.N.A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical out-comes. **JAMA** ., **276**: 1229-35, 1996.

FRONTHINGHAM, R. & WILSON, K. H. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. **J. Bacteriol.**, **175**, 1993.

GARDNER, E. J. & SNUTAD, D. P. Genética. **Guanabara**, 7ª ed. 179-246, 1986.

GONZALEZ, N.; TORRES, M. J.; AZNAR, J.; PALOMARES, J. C. Molecular analysis of rifampin and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Seville, Spain. **Tuber. Lung. Dis.**, **79(3)**: 187-90, 1999.

HAYASHI, K. PCR-SSCP – rapid and easy detection of DNA-sequence changes. **Hum. Cell.**, **5**: 180-4, 1992.

HATFULL, G. F.; JACOBS, W. R. Molecular Genetics of Mycobacteria. **ASM Press, Washington**, 2000.

HEEP, M.; BRANDSTATTER, B.; RIEGER, U.; LEHN, N.; RICHTER, E.; RUSCH-GERDES, S.; NIEMANN, S. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, **39**: 107-10, 2001.

HEYM, B.; ALZARI, P. M.; HONORÉ, N.; COLE, S. T. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol. Microbiol.**, **15**: 235-45, 1995.

HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; MAMIZUKA, E.M.; LEITE, C.Q.F. Aplicação de técnicas de biologia molecular na avaliação da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas antimicrobianas. **Revista Ciênc. Farm.** , **18(1)**: 87-100, 1997.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S. T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins – 9th ed. 597-603. 1994.

HUANG, H.; JIN, Q.; MA, Y.; CHEN, X.; ZHUANG, Y. Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in China. *Tuberculosis*, **82**: 79-83, 2002.

IKEDA, R.M.; BIRKHEAD, G.S.; DiFERDINANDO, G.T.; BORNSTEIN, D.L.; DOOLEY, S.W.; KUBICA, G.P.; MORSE, D.L. Nosocomial tuberculosis: an outbreak of a strain resistant to seven drugs. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **16**: 152-60, 1995.

JACOBS, W. R.; BARLETTA, R. G.; UDANI, R. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science*, **260**: 819-22, 1993.

JACOBS, R.F. Multiple-Drug-Resistant tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, **19**: 1-10, 1994.

JEREB, J.A. ; KLEVEN, R.M.; PRIVETT, T.D.; SMITH, P.J.; CRAWFORD, J.T.; SHARP, V.L.; DAVIS, B.J.; JARVIS, W.R.; DOOLEY, S.W. Tuberculosis in health care workers at a hospital with outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Intern. Med.*, **155**: 854-9, 1995.

KAPUR, V.; LI, L.; IORDANESCU, S.; HAMRICK, M.R.; WANGER, A.; KREISWIRTH, B.N.; MUSSER, J.M. Characterization by Automated DNA Sequencing of Mutations in the Gene (rpo β) Encoding the RNA Polymerase β Subunit the Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from New York City and Texas. *J. Clin. Microbiol.*, **32**: 1095-8, 1994.

KELLER, G. H. & MANK, M. M. DNA Probes. Stockton press, 2^a ed. 462-5, 550-2. 1993.

KIM, B.; LEE, K.; PARK, B.; KIM, S.; BAI, S.; KOOK, Y. Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputa by nested PCR-Linked Single-Strand Conformation Polymorphism and DNA sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 2610-7, 2001.

KREMER, K.; VAN SOLLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W. H.; HERMANS, P. W. M.; MARTIN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 2607-18, 1999.

LEITE, C. Q. F.; VIANA, B. H. J. ; LEITE, S. R. A.; JUAREZ, E. Incidence of *M.tuberculosis* and other mycobacteria on pulmonary infections in Araraquara-S.P,1993. **Rev. Microbiol.**, 26 : 101- 105, 1995.

MANI, C.; SELVAKUMAAR, N.; NARAYANAN, S.; NARAYANAN, PR. Mutations in the *rpoB* gene multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. . **J. Clin. Microbiol.**, 39: 2987-90, 2001.

MARIANI, F.; PICCOLELLA, E.; COLIZZI, V.; RAPPUOLI, R.; GROSS, R. Characterization of na IS-like element from *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Gen. Microbiol.**, 35: 273-7, 1997.

MAXAM, A. M. & GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 74: 560-4, 1977.

MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E.; ARBEIT, R. D. Molecular epidemiology: 17 application of contemporary technique to the typing of microorganisms. **Clin. Infect. Dis.**, 17: 153-64, 1993.

MAZA, L. M.; PEZZLO, M. T.; BARON, E. J. Atlas de Diagnóstico em Microbiologia. **Artmed**. 1999.

MAZUREK, G.H.; CAVE, M.D.; EISENACH, K.D.; WALLACE, JR, R.J.; BATES, J.M.; CRAWFORD, J.T. Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain specific markers for epidemiologic study of tuberculosis .**J. Clin Microbiol.** , 29: 2030-33, 1991.

MIDDLEBROOK G.; REGIARDO, Z.; TIGERTT, W. D.; Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **115**: 1066-9, 1977.

MIKHAILOVICH, V.; LAPA, S.; GRYADUNOV, D.; SOBOLEV, A.; STRIZHKOV, B.; CHERNYH, N.; SKOTNIKOVA, O.; IRTUGANOVA, O.; MOROZ, A.; LITVINOV, V.; VLADIMIRSKII, M.; PERELMAN, M.; CHERNOUSOVA, L.; EROKHIN, V.; ZASEDATELEV, A.; MIRZABEKOV, A. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hibridization, PCR and ligase detection reation on oligonucleotide microchips. **J. Clin Microbiol.**, **39**: 2531-40, 2001.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. Microbiologia Médica, 2ªed., Ed. Manole Ltda., São Paulo, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano Nacional de Controle da Tuberculose. Brasília, 1998MORRE, W. E. C.; CATO, E. P.; MORRE, L. V. H. Index of the bacterial and yest nomenclatural changes published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 approved lists of bacterial names. **Int. J. Sust. Bacteriol.**, **35**: 382-405, 1985.

MORRIS,S.; BAI, G.H.; SUFFYS, P.; PORTILLO-GOMEZ, L.; FAIRCHAK, M.; ROUSE, D. molecular Mechanisms of Multiple Drug Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* .**J. Infect. Dis.** , **171**: 954-60, 1995.

MUSSER, J. M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. **Clin. Microbiol. Rev.**, **8**: 496-514, 1995.

OLIVEIRA, M. M.; SILVA, R. A.; CARDOSO, O.M. ; GOMES, H.M.; FONSECA, L.; WERNECK-BARRETO, A. M.; VALIM, A. M.; ROSSETTI, M. L.; ROSSAU, R.; MIJS, W.; VANDERBORGHT, B.; SUFFYS,P. Rapid detection of resistance against rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Brazilian patients using a reverse-phase hybridization assay. **J. Microbiol. Methods.**, **53**(3): 335-42, 2003.

ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEIYA, T.; TAYASHI, K. Rapid and Sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. **Genomics**, **5**: 874-9, 1989.

PABLOS-MENDEZ, A.; RAVIGLIONE, M.C.; LASZLO, A.; BINKIN, N.; RIEDER, H.L.; BUSTREO, F.; COHN, D.L.; LAMBREGTS-VAN WEEZENBEEK, C.S.; KIM, S.F.; CHAULET, P.; NUNN, P. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization- International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. **N. Engl. J. Med.**, **338**: 1641-9, 1998.

PANUNTO, A. C.; VILLARES, M. C. B.; RAMOS, M. C. IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* from patients admitted to a reference hospital in Campinas, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **36**: 1397-401, 2003.

PESQUISA FAPESP. Frente de combate à tuberculose. **Pesquisa Fapesp** **74**: 22-4, 2002.

PFYFFER, G. E.; WELSCHER, H-M.; KISSLING, P. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 364-8, 1997.

PIATEK, A.S.; TELENTI, A.; MURRAY, M.R.; EL-HAJJ, H.; JACOBS, W.R.; KRAMER, F.R.; ALLAND, D. Genotypic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Two Distinct Populations Using Molecular Beacons: Implication for Rapid Susceptibility Testing. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **44**: 103-10, 2000.

RAMASWAMY, S. & MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agents resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : 1998 update. **Tuber. Lung. Dis.**, **79**(1): 3-29, 1998.

RAMOS, M.C.; VILLARES, M.C.B.; JAQUES, M.; ROSCANI, A.L.C.; ROSCANI, G.N.; ALVES, E.P. - Estudo bacteriológico retrospectivo das infecções micobacterianas em pacientes portadores da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). **Braz J Infect Dis**, **4**(2): 86-90, 2000.

ROSSAU, R.; TRAORE, H.; BEENHOUWER, H. D.; MIJS, W.; JANNES, G.; RIJK, P. D.; PORTAELS, F. Evaluation of the INNO-LIPA Rif. TB assay, a Reverse hybridization assay for the Simultaneous Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **41**: 2093-8, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York. Cold spring Harbour Laboratory Press, 1989.

SCARPELLINI, P.; BRAGLIA, S.; BRAMBILLA, A. M.; DALESSANDRO, M.; CICHERO, P.; GORI, A.; LAZZARIN, A. Detection of rifampin resistance by single-strand conformation polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 2802-6, 1997.

SCARPELLINI, P.; BRAGLIA, S.; CARRERA, P.; CEDRI, M.; CICHERO, P.; COLOMBO, A.; CRUCIANELLI, R.; GORI, A.; FERRARI, M.; LAZZARIN, A. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **43**: 2550-4, 1999.

SELVAKUMAR, N.; DING, B.C.; WILSON, S.M. Separation of DNA Strands Facilitates Detection of Point Mutation by PCR-SSCP. **Biotechniques**, **22**: 604-6, 1997.

SIMONE, P. M.; DOOLEY, S. W. Multidrug-Resistant Tuberculosis. CDC, MMWR, 1994.

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. **Clin. Microbiol.** **16**: 463-96, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Alguns dados sobre tuberculose, 2000.

SPINDOLA DE MIRANDA, S.; KRISKI, A.; FILLIOL, I.; MABILAT, C.; PANTEIX, G.; DROUET, E. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain's isolated in Brazil and France. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **96**: 247-50, 2001.

SREEVATSAN, S.; BOOKOUT, J. B.; RINGPIS, F. M.; MOGAZEH, S. L.; KREISWIRTH, B. N.; POTTATHIL, R. R.; BARATHUR, R. R. Comparative evaluation of Cleavase Fragment Length Polymorphism with PCR-SSCP and PCR-RFLP to detect antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol. Diagn.**, **3**: 81-91, 1998.

TAKIFF, H. E.; SALAZAR, L.; GUERRERO, C. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **38**: 773-80, 1994.

TANIGUCHI, H.; ARAMAKI, H.; NIKAIDO, Y.; MIZUGUCHI, Y.; NAKAMURA, M.; KOGA, T.; YOSHIDA, S. Rifampicin resistance and mutation of the rpo β gene in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS**, **144**: 103-8, 1996.

TELENTI, A.; LOWRIE, D.; MATTER, L.; IMBODEN, P.; COLE, S.; SCHOPFER, K.; MARCHESI, F.; COLSTON, M.J.; BODMER, T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Lancet**, **341**: 647-50, 1993a.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; SCHMIDHEINI, T.; BODMER, T. Direct, Automated Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Polymerase Chain Reaction and Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **37**: 2054-8, 1993b.

TELENTI, A.; HONORÉ, N.; BERNACONI, C.; MARCH, J.; ORTEGA, A.; HEYM, B.; TAKIFF, H.E.; COLE, S.T. Genotypic assessment of Isoniazid and Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a Blind Study at Reference Laboratory Level. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 719-23, 1997.

TELLES M. A., A. BORI, A. B. AMORIM, A. F. CRUZ, M. I. PINI, AND D. N. SATO. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) system. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **35**: 1127-1131, 2002.

TISDALL, P. A.; DEYOUNG, D. R.; ROBERTS, G. D.; ANHALT, J. P. Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas chromatography: a 10-month follow-up study. **J. Clin. Microbiol.**, **16**: 400-2, 1982.

THIERRY, D.A.; BRISSON-NOEL, V. VINCENT- LEVY- FREBAULT, S. NGUYEN, J. GUESDON AND B. GICQUEL. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 2668-2673, 1990.

TORRES, M. J.; CRIADO, A.; PALOMARES, J. C.; AZNAR, J. Use of Real-Time PCR and Fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, **38**: 3194-9, 2000.

TRABULSI, L. R. Microbiologia. **Atheneu**, 2ª ed. 187-97, 1996.

VALIM, A.R.; ROSSETTI, M.L.; RIBEIRO, M.O.; ZAHA, A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, **38**: 3119-22, 2000.

van EMBDEN, J.D.; M.D. CAVE, J.T. CRAWFORD, J.W. DALE, K.D. EISENACH, B. GICQUEL, P.W.M. HERMANS, C. MARTIN, R.A.; MCADAM, T.M. SHINNICK, AND P.M. SMALL. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized Methodology. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 406-409, 1993.

van SOOLINGEN, D., P.W.M. HERMANS, P.E.W. DE HAAS, D. R. SOLL, AND J.D.A. VAN EMBDEN. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains; evaluation of IS-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbil.**, **29**: 2578-2586, 1991.

van SOOLINGEN, D.; HAAS, P. E. W.; HERMANS, P. W.M.; GROENEN, P. M. A.; van EMBDEN, J. D. A. Comparison of various repetitive DNA elements as genetics markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 1987-95, 1993.

van SOOLINGEN, D. & HERMANS, P. W. M. Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. **Eur. Respir. J.**, **8**: 649s-656s, 1995.

van SOOLINGEN, D.; BAUER, J.; RITACCO, V.; LEO, S. C.; PAVLIK, I.; VINCENT, V.; RASTOGI, N.; GORI, A.; BODMER, T.; GARZELLI, C.; GARCIA, M. J. IS 1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization., **J. Clin. Microbiol.**, **36**: 3051-4, 1998.

van SOOLINGEN, D.; HAAS, P. E. W.; KREMER, K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. National Institute of Public Health and Environmental, Bilthoven, The Netherlands, 1999.

VIADER-SALVADO, J.M.; LUNA-AGUIRRE, C. M.; REYES-RUIZ, J. M.; VALDEZ-LEAL, R.; Del BOSQUE-MONCAYO, M. L.; TIJERINA-MENCHACA, R.; GUERRERO-OLAZARAN, M. Frequency of mutations in rpoB and codons 315 and 463 of katG in rifampin and/or isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northeast México. **Microb. Drug. Resist.**, **9**: 33-8, 2003.

VILLARES-OLIVEIRA, M.C.B. Estudo bacteriológico das micobactérias isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Unicamp, visando, em especial, às micobactérias outras que não *M. tuberculosis*-MOTT .São Paulo (SP), 1990[M.Sc. Thesis- ICB-USP]

WILLIAMS, D. L.; WAGUESPACK, C.; EISENACH, K. Characterization of rifampicin-resistance in pathogenetic mycobacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.** **38**: 2380-6. 1994.

WOLINSKY, E. Conventional diagnostic methods for tuberculosis. **Clin. Infect. Dis.**, **19**: 396 - 401, 1994.

Endereços Eletrônicos:

<http://www.saude.gov.br/programas/tuberculose>.

<http://www.nib.unicamp.br/sbpt/daddeptb.html>

http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis

http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/Cve_tb.htm



8 - *ANEXOS*

ANEXO 1

Isolados de *Mycobacterium tuberculosis* utilizados no estudo cedidos pelo Laboratório de Microbiologia – Seção de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do HC/UNICAMP, segundo a data do isolamento da amostra, sexo do paciente e droga que apresentava resistência

Nº AMOSTRA	Nº ESTUDO	DATA DE ISOLAMENTO	SEXO	RESISTÊNCIA
2037	101	07/2001	M	I/R
2693	102	07/2001	M	I
2850	103	07/2001	M	I/R/P
3231	104	07/2001	F	R/P
3307	105	07/2001	M	I/R/P
3312	106	07/2001	M	S/I
Mtb 14323	MT90	08/2001		SENSÍVEL
1023	1023	08/2001		SENSÍVEL
1200	1200	08/2001		SENSÍVEL
3383	3383	08/2001		SENSÍVEL

Mtb 14323 – Cepa de referência de *Mycobacterium tuberculosis*,
I- Isoniazida, R- Rifampicina e P- Pirazinamida

ANEXO 2

Isolados de *Mycobacterium tuberculosis* utilizados no estudo cedidos pelo Instituto Adolfo Lutz (Laboratório de referência para Tuberculose do Estado de São Paulo), segundo a data do isolamento, sexo do paciente, droga que apresentava resistência e a procedência.

Nº cepa no IAL	Nº estudo	DATA DE ISOLAMENTO	SEXO	RESISTÊNCIA	Procedência
1206	1	05/2000	M	I/R	MOGI DAS CRUZES
93849	2	01/2000	M	I	SÃO PAULO
724	3	03/2000	M	I	ITAPECIRICA
44	4	01/2000	M	I	SÃO PAULO
326	5	02/2000	F	I	SÃO PAULO
596	6	03/2000	M	I/R	SÃO PAULO
6	8	01/2000	M	I	SANTOS
523	9	02/2000	M	I	SÃO PAULO
1210	10	05/2000	M	I	MOGI DAS CRUZES
585	11	02/2000	M	I/R/S/P	SÃO PAULO
92433	12	08/1999	F	I/R	CAMPINAS
93966	13	01/2000	M	I/R/P/E/S	SÃO PAULO
1243	14	05/2000	M	I/R	SÃO PAULO
597	15	03/2000	M	I/R/P/E	SÃO PAULO
1237	16	05/2000	F	I	TAUBATÉ
94018	17	01/2000	F	I	SÃO PAULO
93898	18	02/2000	M	I/R/P/E	OSASCO

Nº cepa no IAL	Nº estudo	DATA DE ISOLAMENTO	SEXO	RESISTÊNCIA	Procedência
702	19	03/2000	F	I/S	ITAPECIRICA
18	20	01/2000	M	I/R	SÃO PAULO
93843	21	01/2000	M	I	SÃO PAULO
582	22	03/2000	M	I/R/E	SÃO PAULO
183	23			SENSÍVEL	
1195	24	05/2000	M	I/R/P/E	SANTOS
92506	25 E 39	08/1999	F	I/R/P	SÃO PAULO
92817	26	10/1999	M	I/R	OSASCO
1194	7 E 27	05/2000	F	I/R	SANTOS
1438	28	04/2000	F	I/R	SÃO PAULO
92247	29	08/1999	M	I/R	SÃO PAULO
52	30	01/2000	F	I	SÃO PAULO
1250	31	05/2000	F	I/R	SÃO PAULO
92973	32	10/1999	F	I/R	SÃO PAULO
364	33	02/2000	M	I	SÃO PAULO
489	34	02/2000	M	I	SÃO PAULO
92507	35	08/1999	F	I/R/P	SÃO PAULO
91242	36	05/1999	F	I/R	SÃO PAULO
213	37	02/2000	M	I	SÃO PAULO
92508	38	08/1999	F	I/R/P	SÃO PAULO
425	40	02/2000	M	I	SANTOS
2335	41	07/2000	F	I/R/P	MOGI DAS CRUZES
2627	42	08/2000	M	I/R	SÃO PAULO

Nº cepa no IAL	Nº estudo	DATA DE ISOLAMENTO	SEXO	Resistência	Procedência
2429	43	08/2000	F	I/R	SANTOS
2423	44	08/2000	M	I/R/P	SANTOS
3059	45	09/2000	M	I/R	CAMPINAS
2248	46	07/2000	M	I/R	MATO GROSSO DO SUL
2898	47	09/2000	M	I/R	TAUBATÉ
130	48	02/2000	M	I/R	S. JOSÉ CAMPOS
553	49	03/2000	M	I	OSASCO
1246	50	05/2000	M	I/R/S	SÃO PAULO
93492	52	02/2000	F	I/R/P	SÃO PAULO
1210	51	05/2000	M	I	MOGI DAS CRUZES
1285	53	05/2000	F	I/R/E	CAMPINAS
402	54	02/2000	F	I	S.JOSÉ CAMPOS
482	55	02/2000	F	I	SÃO PAULO
93459	56	02/2000	M	R	SÃO PAULO
3076	57	08/2000	M	I/R	MOGI DAS CRUZES
3135	58	08/2000	M	I/R	SÃO PAULO
3089	59	08/2000	M	I/R/P	SANTOS
2937	60	08/2000	M	I/R	MOGI DAS CRUZES

Nº cepa no IAL	Nº estudo	DATA DE ISOLAMENTO	SEXO	RESISTÊNCIA	Procedência
2842	61	08/2000	M	I/R	SÃO PAULO
3064	62	08/2000	M	I/R	CAMPINAS
2810	63	08/2000	M	I/R	CAMPINAS
2841	64	08/2000	F	I/R/P	SÃO PAULO
3079	65	08/2000	M	I/R/P/E	MOGI DAS CRUZES
2808	66	08/2000	F	I/R/P	CAMPINAS
2365	67	07/2000	M	I/R	SÃO PAULO
2730	68	08/2000	M	I/R/P	SÃO PAULO
2645	69	08/2000	M	I/R/P	SÃO PAULO
2371	70	07/2000	M	I/R	SÃO PAULO
2715	71	08/2000	M	I/R/P	RIBEIRÃO PRETO
2763	72	08/2000	M	I/R	SANTOS
2626	73	08/2000	M	I/R	SÃO PAULO
2637	74	08/2000	M	I/R	SÃO PAULO
2406	77	08/2000	F	I/R	SANTOS
2732	75	08/2000	F	I/R/P	SÃO PAULO
2846	76	08/2000	M	I/R/P	SÃO PAULO
2466	88	08/2000	M	I/R	SÃO PAULO
2802	79	08/2000	F	I/R	CAMPINAS

Nº cepa no IAL	Nº estudo	DATA DE ISOLAMENTO	SEXO	RESISTÊNCIA	Procedência
2266	80	08/2000	M	I/R/P/E	SÃO PAULO
2295	81	07/2000	M	I/R/P/E	SÃO PAULO
2428	82	08/2000	M	I/R/P	SANTOS
2316	83	09/2000	M	I/R	MOGI DAS CRUZES
2324	84	07/2000	M	I/R/P	MOGI DAS CRUZES
2461	85	08/2000	M	I/R	SÃO PAULO
2518	86	08/2000	M	I/R	SÃO PAULO
2431	87	08/2000	M	I/R/P	SÃO PAULO
2341	88	08/2000	M	I/R/P	SÃO PAULO
2325	89	07/2000	M	I/R/P/S	MOGI DAS CRUZES

IAL- Instituto Adolfo Lutz ; F – Feminino, M- Masculino

I- Isoniazida, R- Rifampicina, P- Pirazinamida, S- Estreptomicina e E- Etambutol.

*Soluções Utilizadas***1- Extração do DNA Genômico****Tris 1M***

Tris base.....121,1g

Água ultra pura.....800mL

Ajustar o pH para 8,0 adicionando HCl puro.

Completar o volume com água ultra pura para 1000mL.

EDTA 0,5M pH 8,0*

EDTA.....186,1g

Água ultra pura.....800mL

Dissolver sob agitação, ajustar o pH para 8,0 com NaOH a 1N.

Completar o volume com água ultra pura para 1000mL.

Tampão TE 10X*

TRIS/HCl 1mM, pH8,0.....10mL

EDTA 0,5mM.....2mL

Completar o volume com água ultra pura para 1000mL.

Solução de lisozima

10mg/mL de água ultra pura esterilizada.

Estocar em alíquotas a -20°C.

SDS (Sodium Duodecyl Sulfato) 10%

SDS.....10g

Água ultra pura.....100mL

Dissolver a solução sob aquecimento a 65°C por 20 minutos e estocar a temperatura ambiente.

Solução de Proteinase K

10mg de proteinase K/mL de água ultra pura esterilizada.

Estocar em alíquotas a -20°C.

Solução de SDS/Proteinase K

Solução de Proteinase K.....5µL

SDS 10%.....70µL

NaCl 5M*

NaCl.....29,12

Água ultra pura.....100mL

Estocar à temperatura ambiente

Solução CTAB/NaCl

NaCl.....4,1g

Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB).....10g

Água ultra pura80mL

Dissolver a solução sob aquecimento à 65°C. Completar o volume para 100mL com água ultra pura . Estocar a temperatura ambiente.

Clorofórmio/Álcool isoamílico (24:1)

Misturar 24 volumes de clorofórmio com 1 volume de álcool isoamílico.

* Soluções autoclavadas a 121°C por 20 minutos.

2- Corrida Eletroforética

Tampão TEB 10X

Tris Base108g

Ácido Bórico.....55g

EDTA 0,5M pH 8,040mL

Dissolver o Tris base e o ácido bórico em 700mL de água ultra pura, adicionar o EDTA e completar para 1000mL de água ultra pura. Estocar a temperatura ambiente.

3- Southern Blotting

HCl 1M

HCl concentrado.....85,5mL

Completar o volume para 1000mL com água ultra pura. Estocar a temperatura ambiente.

Solução de Depuração (HCl 0,25M)

HCl 1M.....85,5mL

Completar o volume para 1000mL com água ultra pura. Estocar a temperatura ambiente.

NaOH 4M

NaOH base.....160g

Completar o volume para 1000mL com água ultra pura. Estocar a temperatura ambiente.

Solução de Denaturação (NaOH 0,4M)

NaOH 4M.....100mL

Completar o volume para 1000mL com água ultra pura. Estocar a temperatura ambiente.

SSC 5X*

NaCl.....175,3g

Citrato de Sódio.....88,2g

Completar o volume para 1000mL com água ultra pura. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5M. Estocar a temperatura ambiente.

* Soluções autoclavadas a 121°C por 20 minutos.

4 –Hibridização

Solução de Hibridização (Kit ECL- direct nucleic acid labelling and detection systems - Amersham)

Tampão de hibridização.....50mL

Reagente blocking.....2,5g

NaCl.....1,5g

Aquecer a 42°C sob agitação o tampão de hibridização e adicionar o reagente blocking e o NaCl.

Tampão primário de lavagem

Uréia.....72g

SDS.....0,8g

SSC 20X.....5mL

Completar o volume para 200mL com água ultra pura. Utilizar em seguida.

Tampão secundário de lavagem (SSC 2X)

SSC 20X.....50mL

Completar o volume para 450mL com água ultra pura. Utilizar em seguida.

5 – Soluções para o SSCP

Tampão para diluição das amostras de SSCP

(5mL Total do Volume)

4,75 mL de formamida

0,125 mL Solução de xleno-cianol a 1%

0,125 mL de Solução de azul de bromofenol a 1%

Solução de xleno-cianol a 1%

0,1 g de xleno-cianol sólido diluído em 10mL de Água destilada

Solução de Azul de bromofenol a 1%

0,1 g de Azul de bromofenol sólido diluído em 10mL de Água destilada

Condições de eletroforese para SSCP

Tampão utilizado: Buffer pH 9.0 – Starter Kit (Amersham Pharmacia Biotech®)

	Temp.	Voltagem	Corrente	Potência	Tempo
Fase 1	5°C	90 V	6mA	5W	25 mín.
Fase 2	5°C	500V	14mA	10W	90 mín.

6 – Sequenciamento Automático

Gel de poliacrilamida utilizado para o Sequenciamento

4,5% de acrilamida/bis-acrilamida (19:1, volume final 10mL)

36g de Uréia

1g Resina Dowex

10mL Tampão TBE 10X

Tampão TBE 10X

108g Tris

55g Ácido Bórico

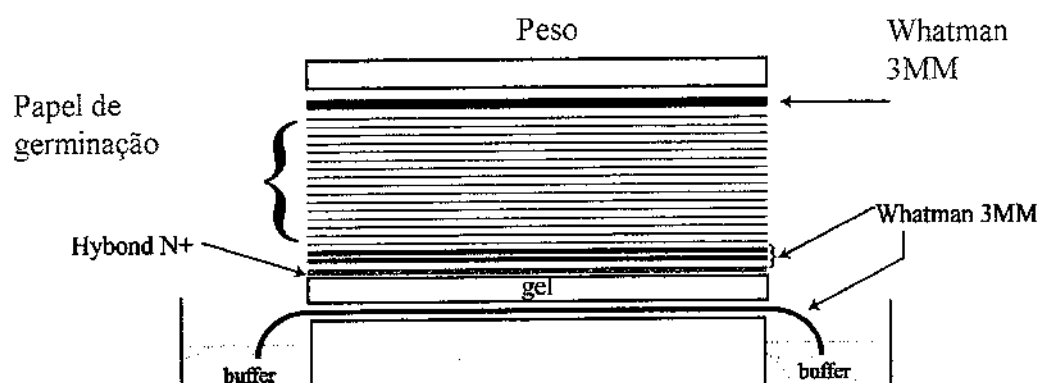
8,3g EDTA dissódico

Ajustar o volume para 1000mL com Água destilada.

Condições para Eletroforese do Sequenciamento

Pot. Laser	Temp.	Voltagem	Corrente	Potência	Tempo
40mW	50°C	1680KV	50mA	150W	180 mín

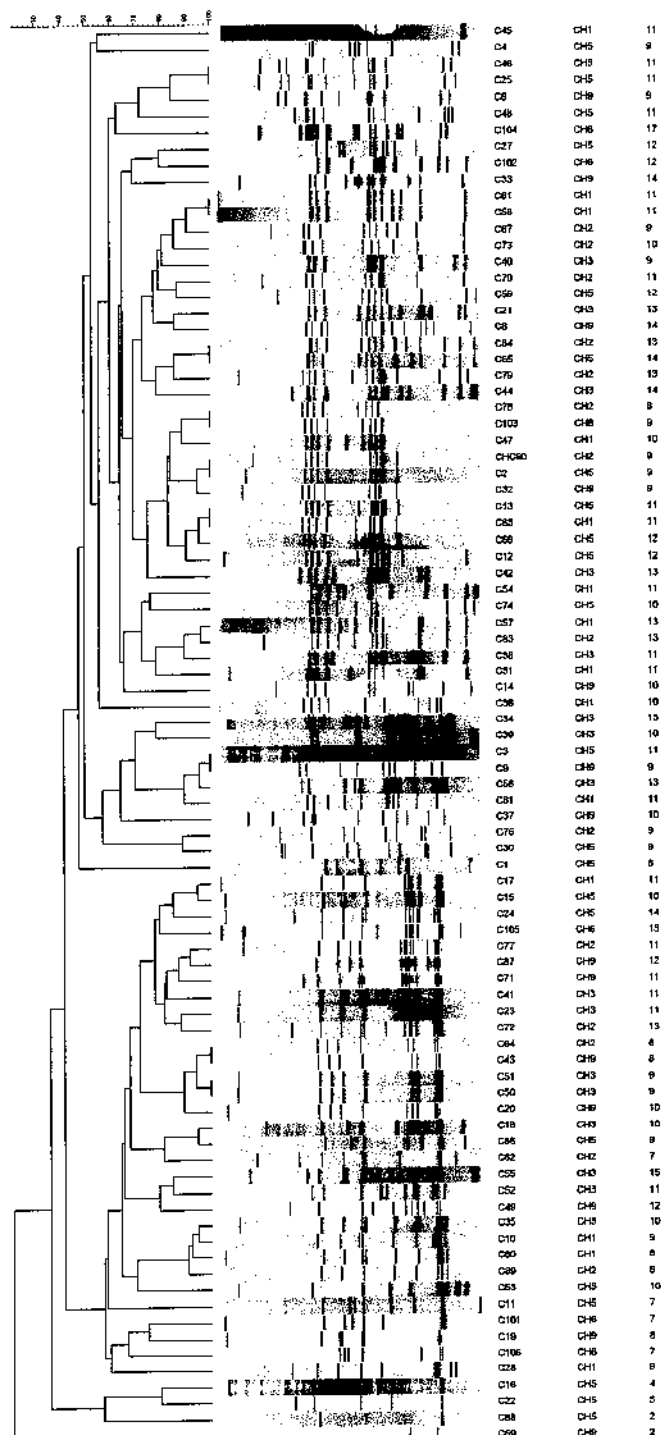
Representação esquemática do método "Southern Blotting" por capilaridade



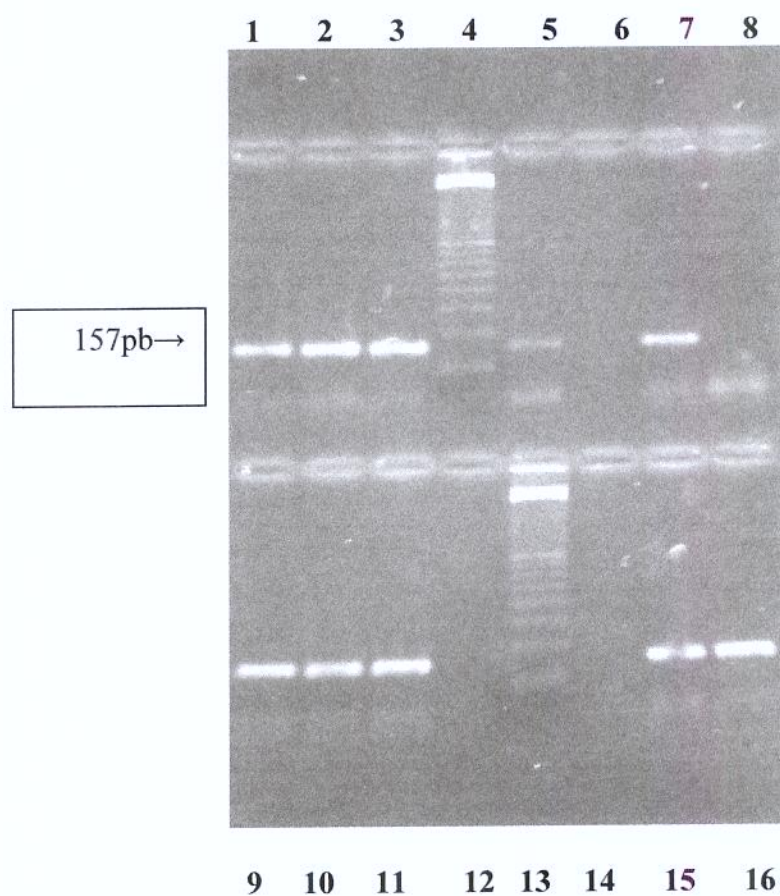
**Análise de Resultados do RFLP feito pelo programa computacional *GelCompar II*,
versão 2.5 (Applied Maths®, Kortrijk, Belgium).**

Doc: Gel (04/95) (14 1 05-12/95) (462/26 3-4-95) (9 05-05/95)
RFLP

RFLP

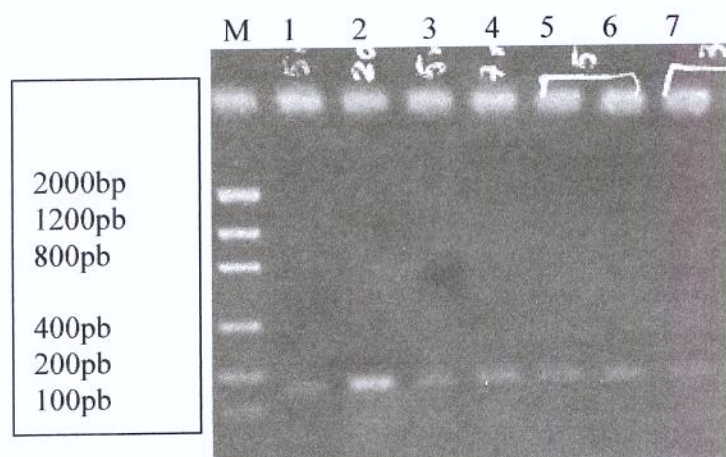


Amplificação dos oligonucleotídeos na posição de 157pb por PCR



Canaletas 4 e 13 - Marcador de peso molecular 100pb (Life Technologies®)
Canaletas 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 15 e 16 PCR das amostras de *Mycobacterium tuberculosis*
Canaletas 6, 12 e 14 Branco para PCR

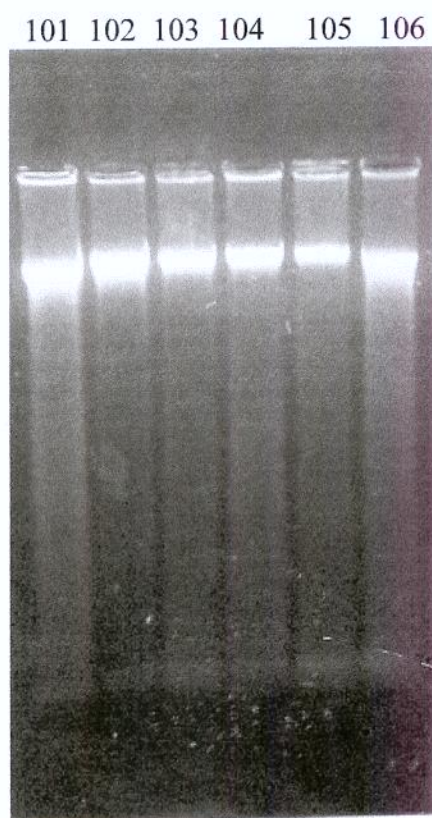
Purificação dos fragmentos de DNA amplificados pela PCR



M = Marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®)
Canaletas de 1 a 7 : Oligonucleotídeos amplificados

Fragmentos com de 100pb a 200pb, utilizando 4μL de 10 a 20ng.

Extração do DNA de *Mycobacterium tuberculosis*



Canaletas de 101 a 106 – Extrações das amostras de *Mycobacterium tuberculosis* da coleção do Laboratório de Micobactérias/DPC/HC/UNICAMP

**Artigo enviado em Julho/2003 para a AAC (Antimicrobial Agents and
Chemotherapy)**

**CHARACTERIZATION OF MUTATIONS IN THE GENE (*RpoB*)
ENCODING THE RNA POLYMERASE BETA SUBUNIT IN
RIFAMPIN-RESISTANT *Mycobacterium tuberculosis* STRAINS FROM
SÃO PAULO, BRAZIL.**

**Erica Mary Pavan¹, Maria Cecilia. B. Villares¹, Christian C. Hofling¹, Carmem M S
Giampaglia², Lucilaine Ferrazoli ², Dalva C G Aily², Dulcinéia M de Albuquerque ³,
and Marcelo de C. Ramos ⁴**

**Institution: 1. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas,
Campinas, São Paulo, Brazil; 2. Instituto Adolfo Lutz; and 3. Hemocentro,
Universidade Estadual de Campinas, Brazil.**

Running title: Tuberculosis and Rifampicin Resistance

Total number of words:

Key words: Tuberculosis, Rifampicin, Resistance, *rpoB*

ABSTRACT

Isoniazid, rifampin, and pyrazinamide, have been used as the standard treatment for tuberculosis in many countries, including Brazil. Antimicrobial resistance among *Mycobacterium tuberculosis* strains results in increased morbidity, mortality and costs of health care. Control of tuberculosis is thus threatened by widespread emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* as reported worldwide.

Mutations in the *rpoB* gene seems to be the most prevalent mechanism involved in rifampin resistance among *M. tuberculosis* strains.

To characterize the genetic basis of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil, mutations involved in rifampin resistance were detected using single strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing studies. A sample consisting of 73 isoniazid resistant and 5 isoniazid sensitive isolates recovered from August, 1999 through September, 2000 was screened for susceptibility to rifampin. As a result, 13 susceptible, and 65 resistant strains were detected. Genomic DNA was obtained from each isolate, and a fragment consisting of 157 bp of the *rpoB* gene was amplified, and submitted to SSCP and sequencing studies. Mutations involving codon 511 through codon 533 were identified. S531L (44%) was the most prevalent mutation found, followed by H526D (21%), and H526Y, L533P, D516V, Ins Phe₅₁₄, Met₅₁₅ (3% each). Our study corroborates previous studies done in Brazil which identified S531L as the most prevalent mutation, and several other mutations on the same gene segment (codon 511 through 533).

INTRODUCTION

Mycobacterium tuberculosis is the causative agent of tuberculosis and one of the leading causes of death worldwide (21) AIDS pandemics, and the emergence of bacterial resistance to the regular chemotherapeutic agents used in the treatment of tuberculosis have brought much concern to developed and undeveloped world (22).

Brazil is very much affected by this problem. Large urban centers, like those from the State of São Paulo, show incidence rates of tuberculosis (TB) as high as 52.5/100,000 inhabitants. Deaths attributed to TB during 1998 reached 1,521 patients (4.3 cases/100,000 inhabitants) (3). The impact of drug-resistance on this data is not known. From 1994 through 1997 the estimated rate of drug resistance in São Paulo city was 6.3% for isoniazid, 2.9% for rifampin, 7.1% for streptomycin, 0.3% for ethambutol and 0% for pirazinamide (4). In the year 2000 the estimated rate of multi-drug resistant tuberculosis for the whole country, as defined by the World Health Organization, was 0.9% of all TB cases (5). Since all MDR strains are resistant to rifampicin (RIFr), the rapid detection of mutations within the *rpoB* gene may be used for presumptive identification of MDR-TB (6,8,9)

The genetic basis of rifampin resistance is mostly due to mutations in a 69-bp region of the *rpoB* gene, which encodes the beta subunit of the *M. tuberculosis* RNA polymerase(16), corresponding to codons 511 through 533.

In Brazil, a few sequencing or hybridization studies have focused this problem. S531L mutations were found in most of rifampin resistant strains tested (11,15,18).

MATERIALS AND METHODS

***M. tuberculosis* isolates** - A sample consisting of 73 isoniazid resistant and 5 isoniazid sensitive isolates belonging to a collection from the Instituto Adolfo Lutz [Central Laboratory, State Health Service, São Paulo] (=68 strains), and to the Mycobacterial Laboratory, Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-UNICAMP), in Campinas (=10 strains), recovered from August, 1999 through September, 2000, was screened for susceptibility to rifampin and submitted to further studies. As a result, 13 susceptible, and 65 resistant strains were detected. The first mentioned laboratory is the institutional reference for the São Paulo State Health Services for *M. tuberculosis* antimicrobial susceptibility.

Full grown cultures, as they were sent to the laboratory, were re-seeded on new Lowenstein Jensen (LJ) slants before preservation into glass bead added Sauton broth and kept frozen in a temperature of -20 to -70°C. For genotyping and antimicrobial susceptibility test purposes, one bead was streaked out onto new LJ slants for full growth.

DNA fingerprinting - All isolates were also analysed by IS6110 RFLP fingerprinting, using an internationally standardized method (19,20) to differentiate possible genotypic relationship among the strains. Comparison of DNA patterns was performed with GelCompar II, version 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Relatedness of strains was calculated using Dice similarity coefficient with 2% band position tolerance. The cluster analysis was done by use of the unweighted pair-group average method.

PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis (12) – A 157-bp fragment of the *rpoB* gene was amplified with the use of primers TR8 and TR9 (2, 16). Amplification was carried out in 50µl of a reaction mixture containing 50mMKCL, 10mM Tris(pH 8.0), 2.5mM MgCl₂, 100µM of dNTPs, 1U Taq polymerase, 10pmoles of each primer, and 10ng of chromosomal DNA. Samples were then denatured at 94°C for 5', followed by 40 cycles at 94 °C for 1', 55°C for 1', 72°C for 1', and a final run at 72°C for 8'. Fragments were electrophoresed in 2% EtBr added agarose gels, and checked for the presence of the 157-bp band. SSCP analysis was performed using PCR products from 65 rifampin resistant, and 13 rifampin sensitive strains, using a GenePhor (Amersham Pharmacia Biotech) electrophoresis unit with the GeneGel SSCP Kit (Amersham Pharmacia Biotech), as instructed by the manufacturer, at 5°C and pH 9.0.

DNA sequencing: A sample of 34 strains was sequenced. Sequencing studies of PCR products were done using the automatic DNA sequencer (ABI Prism 377, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), and the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as instructed by the manufacturer. Sequences were further analysed using Chromas software (version 2.22- Technelysium Pty. Ltd.) and a Blast search was performed for nucleotide comparison (1).

RESULTS

The *IS6110* RFLP fingerprinting was performed in 65 rifampin resistant (RIFr), and 13 rifampin sensitive (RIFs) strains. Three clusters were found, consisting of two isolates each. Both strains from only one of the clusters found was submitted to the sequencing study, therefore all, except one, strain were unrelated from the epidemiological standpoint.

The SSCP analysis was performed in 65 RIFr and 13 RIFs strains. 19 distinct patterns were obtained from 5 electrophoresis sessions. We randomly selected 30 to 50% of specimens from each SSCP pattern obtained, as well as all strains exhibiting unique patterns, for sequencing studies.

According to this criteria, a sample (n=34) of PCR products, corresponding to one strain each, was sequenced. The results of the sequencing studies for the 25 RIFr strains and 9 RIFs are shown on table 2.

Table 2. Distribution of strains according to the mutation found and the antimicrobial susceptibility profiles

Codon/Mutation	Resistant to								No resistance	Total (%)
	I	R	I/R	I/R/E	I/R/P	I/R/P/E	I/S	I/R/P/S		
S531L			7	1	5	2				15 (44%)
H526D		1	2		3					6 (18%)
H526Y			1							1 (3%)
L533P								1		1 (3%)
D516V			1							1 (3%)
Ins Phe ₅₁₄ , Met ₅₁₅			1							1 (3%)
No mutation	4						1		4	9 (25%)
Total	4	1	12	1	8	2	1	1	4	34

I- Isoniazid; R- Rifampin; P - Pirazinamide; E- Ethambutol; S- Streptomycin.

No mutation was observed in 9 (25%) strains analysed in this study, all sensitive to rifampin. Among rifampin resistant strains, the most prevalent mutation in a restricted region of the *rpoβ* gene which led to amino acid substitutions were as follows: Ser₅₃₁ (44%), His₅₂₆ (21%), Leu₅₃₃ (3%), Asp₅₁₆ (3%), and one insertion of two codons Phe₅₁₄, Met₅₁₅ (3%).

DISCUSSION

The control of tuberculosis has been of worldwide concern because of its high incidence and the potential spread of drug resistant strains. Rifampin is a key component of

the chemotherapy of tuberculosis. *M. tuberculosis* resistance to this drug is achieved when *rpoB* gene, which encodes a beta-subunit of RNA polymerase, is modified through mutation processes in a few described codons, belonging to a 81-nucleotide RIF resistance-determining region (RRDR). Substitution of key aminoacids would thus result in conformational changes and defective binding of the drug.(17). Few other genomic sites are ascertained as responsible for rifampin resistance.

S531L was the most frequent mutation found among rifampin resistant strains investigated in our work. Other investigators have found the same. Among Brazilian strains (15,18), collected in three country regions, this single mutation was responsible for resistance among 56.2%, and 50% of the isolates. H526 locus was rated the second most prevalent mutation site in the present work as well as in other Brazilian studies. Overall, mutations in this group of Brazilian strains were found in the 78-nucleoside region from the *rpoB* gene corresponding to codons 511, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 522, 526, 527, 531, and 533. A complex mutation corresponding to Ins Phe₅₁₄, Met₅₁₅, found in one strain tested in our study had never been demonstrated before among Brazilian strains. This mutation was reported before by Kapur (7) in a strain from New York. Other investigators from developing countries also found Ser531 as the most prevalent mutation site involved in rifampin resistance. Mani et. al.(8) observed it among 53% of rifampin resistant isolates from several parts of India. In Mexico, Bobadilla-del-Valle et. al. (2) reported 40% of rifampin resistant strains bearing mutations in this site. A wide range of frequencies for mutations within codons 531, and 526 have been reported worldwide. Ramaswanni (14)and Musser(10)studying *M. tuberculosis* strains from several parts of the world reported frequencies of 41 and 36% respectively.

Our study, in conjunction with few others from Brazil, demonstrates that rifampin resistance in this country is mediated by the same mechanisms found in other parts of the world (mutations occurring in the Beta subunit of polymerase gene-*rpoB*). Given this picture, rapid identification techniques as PCR-restriction, and Linear Probe Assays can be applied to Brazilian strains for faster determination of resistance to rifampin, as used by Oliveira et. al (11). These methods are, otherwise, expensive and cannot be used in routine testing.

REFERENCES

1. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-402.
2. Bobadilla-del-Valle, M., A. Ponce-de-Leon, C. Arenas-Huertero, G. Vargas-Alarcon, M. Kato-Maeda, P.M. Small, P. Couary, G. Ruiz-Palacios, and J. Sifuentes-Osornio. 2001. *rpoB* Gene Mutations in Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Identified by Polymerase Chain Reaction Single-Stranded Conformation Polymorphism. *Emerging Infectious Disease.* **7**: 1010-1013.
3. Centro de Vigilância Epidemiológica. 2002. Reports on chronic diseases: tuberculosis. [Online]. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/Cve_tb.htm.
4. Cohn, D., F. Bustreo, and M. C. Raviglione. 1997. Drug resistance in tuberculosis: review of the world-wide situation and WHO/IAUTLD global surveillance project. *Clin. Infect. Dis.* **24** (Suppl 1): S121-130.
5. Dye, C., M. A. Espinal, C. J. Watt, C. Mbiaga, and B. G. Williams. 2002. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **185**: 1197-1202.
6. Edwards, K. J., L. A. Metherell, M. Yates, and N. A. Saunders. 2001. Detection of *rpoB* Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* by Biprobe Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3350-3352.
7. Kapur, V., I. Li, S. Iordanescu, M. R. Hamrick, A. Wanger, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser. 1994. Characterization by Automated DNA Sequencing of Mutations in the Gene (*rpoB*) Encoding the RNA Polymerase β Subunit the Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from New York City and Texas. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1095-8.
8. Mani, C., N. Selvakumar, S. Narayanan, and P. R. Narayanan. 2001. Mutations in the *rpoB* gene multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2987-90.
9. Matsiota-Bernard, P., G. Virioni, and E. Marinis. 1998. Characterization of *rpoB* mutations in rifampicin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 20-23.
10. Musser

11. Oliveira, M. M., da Silva, R. A., Cardoso, O. M., Gomes, F. L., Werneck-Barreto A. M., Valim, *M., Rossetti, M. L., Rossau, R., Mijs, W., Vanderborght, B., and Suffys, P. 2003. Rapid detection of resistance against rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Brazilian patients using a reverse-phase hybridisation assay. **53**: 335-42.
12. Orita, M., Y. Suzuki, T. Seyiya, and K. Tayashi. 1989. Rapid and Sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics*, **5**: 874-9.
13. Pozzi, G., M. Meloni, E. Iona, G. Orrù, ° F. Thoresen, M. L. Ricci, M. R. Oggioni, L. Fattorini, and G. Orefici. 1999. *rpoB* mutations in multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1197-1199.
14. Ramaswanni
15. Spindola de Miranda, S., A. Kritski, , I. Filiol, C. Mabilat, G. Panteix, and E. Drouet. 2001. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Brazil and France. **96**: 247-50.
16. Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, T. Schmidheini, and T. Bodmer. 1993. Direct, Automated Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Polymerase Chain Reaction and Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**: 2054-8.
17. Telles M. A., A. Bori, A. B. Amorim, A. F. Cruz, M. I. Pini, and D. N. Sato. 2002. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**: 1127-1131.
18. Valim A. R., M. L. R. Rossetti, M. O . Ribeiro, and A. Zaha .2000. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3119-22.
19. van Soolingen D., P. E. de Haas, P. W. Hermans, and J. D. van Embden. 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* **235**:196-205.
20. van Soolingen D., P. E. W. Haas, H. R. van Doorn, E. Kuijper, H. Rinder, and M. W. Borgdorff. 2000. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in The Netherlands. *J. Infect. Dis.* **182**:1788-1790.
21. World Health Organization Report 2003, Global Tuberculosis Control. 2003. [Online]. <http://www.who.int/gtb/publications/globrep/index.html>.
22. World Health Organization, The WHO/IUALTD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. 2002. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World. Report no.2: Prevalence and Trends. [Online]. <http://www.who.int/emc/amrtb.html>

Comprovante da submissão do artigo

De: agelmis@asmusa.org <agelmis@asmusa.org> Para: mdecr@unicamp.br
<mdecr@unicamp.br> Data: Terça-feira, 29 de Julho de 2003 15:34 Assunto: Manuscript
submission (AAC00779-03 Version 1) Prof Marcelo C. Ramos Universidade Estadual de
Campinas Medicina Interna Cid Universit Zeferino Vaz Campinas, Sao Paulo 13083-
970 Brazil

Re: CHARACTERIZATION OF MUTATIONS IN THE GENE (RpoB) ENCODING
THE RNA POLYMERASE BETA SUBUNIT IN RIFAMPIN-RESISTANT
Mycobacterium tuberculosis STRAINS FROM SÃO PAULO, BRAZIL (AAC00779-03
Version 1) Dear Dr. Ramos: You have successfully submitted your manuscript via the
Rapid Review system. The control number of your manuscript is AAC00779-03 Version 1.
Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals
Department or with the editor. You may log onto the Rapid Review system at any time to
see the current status of your manuscript and the name of the editor handling it. The URL
is <http://www.rapidreview.com/ASM2/author.html>, and your user name is mdecr. To find
contact information for the editor handling your manuscript, go to the following
URL: <http://www.asmusa.org/jnlsrc/editors.asp>.

In submitting your manuscript to the Antimicrobial Agents and Chemotherapy
(AAC), the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has
not been submitted or published elsewhere. By publishing in the journal, the authors agree
that any plasmids, viruses, and living materials such as microbial strains and cell lines
newly described in the article are available from a national collection or will be made
available in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community
for noncommercial purposes.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you
assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer
agreement is sent with each letter of acceptance after the manuscript has been scheduled for
publication.

If your manuscript is accepted for publication in a 2003 issue, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$38 per page for the first four pages and \$55 for each page in excess of four for a corresponding author who is an ASM member or \$44 per page for the first four pages and \$63 for each page in excess of four for a nonmember corresponding author. To obtain the member rate, a member corresponding author must include his 2003 member number on the reprint/page charge form that will be included with the proofs. To obtain the member rate, a nonmember corresponding author should complete the ASM membership application available online at <http://www.asmta.org/mbrsrc/mbr1.htm> and submit it and payment of the membership fee to ASM. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals, at the following address: Journals Department American Society for Microbiology 1752 N St., NW Washington, DC 20036. The fax number is 202-942-9355. The request must indicate how the work was financed and must be accompanied by copies of the title page and the Acknowledgments section of the paper.

Minireviews, Guest Commentaries, and Letters to the Editor that comment on previously published articles are not subject to page charges. Thank you for submitting your manuscript for consideration. Arthur Gelman Production Editor Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC).