

Christian Cruz Höfling

*Caracterização das Mutações no gene katG
de cepas de Mycobacterium tuberculosis
resistentes à Isoniazida*

Campinas

2005

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
2005

Christian Cruz Höfling

*Caracterização das Mutações no gene katG
de cepas de Mycobacterium tuberculosis
resistentes à Isoniazida*

Tese apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor em
Clínica Médica, área de Clínica Médica.

Orientador: *Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos*

Campinas
2005

DADE 73c
CHAMADA T/UNICAMP
H676c
EX
MBO BCI 64802
OC 16-200086-05
✓
EÇO 11.00
TA 20/07/05
CPD

Bibid 358682

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

H676c

Höfling, Christian Cruz

Caracterização das mutações no gene KatG de cepas de
Mycobacterium tuberculosis resistentes á isoniazida / Christian Cruz
Höfling. Campinas. SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Marcelo de Carvalho Ramos

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Isoniazida. 2. Resistência microbiana a drogas. 3.
Polimorfismo de fragmento de restrição. 4. Polimorfismo genético.
5. ~~Brasil~~ - Epidemiologia. 6. Tuberculose. 7. Análise de
Seqüência. 8. Resistência a drogas. 9. Análise de seqüência de
DNA. 10. Técnica de tipagem bacteriana. I. Ramos, Marcelo de
Carvalho . II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

SLP

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Marcelo de Carvalho Ramos Marcelo de Carvalho Ramos
 2. Prof(a). Dr(a). Mariângela Ribeiro Resende Mariângela R. Resende
 3. Prof(a). Dr(a). Sandra Cecília Botelho Costa Sandra Cecília Botelho Costa
 4. Prof(a). Dr(a). José Fernando de Castro Figueiredo José Fernando de Castro Figueiredo
 5. Prof(a). Dr(a). Sylvia Cardoso Leão Sylvia Cardoso Leão
-

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/01/2005

À minha mãe, pesquisadora consagrada,
pela inspiração e pela valiosa experiência.

Ao meu pai, que sempre foi um auto
didata, pelo equilíbrio e pelas lições de
persistência e criatividade.

À Karina, pelo suporte incondicional, pela
torcida e pelo amor dedicado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos, pelo conhecimento, pela inteligência e pela calma e tranquilidade durante todo o processo.

Aos profissionais do departamento de microbiologia, setor de micobactérias, pelo suporte e paciência comigo, enquanto um aprendiz.

A Dra. Ana Calusni, pelos ensinamentos iniciais nas técnicas de biologia molecular e genotipagem.

Aos profissionais do Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento das amostras e pela colaboração no trabalho.

Aos companheiros do laboratório, pela amizade e contribuição na realização das técnicas, e pelas risadas indispensáveis no ambiente de trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela gentileza e disponibilidade.

A todos os meus professores, que me ensinaram medicina e ainda hoje são minhas referências em conduta e conhecimento.

A UNICAMP, universidade responsável pela minha formação e pelo médico que sou hoje em dia.

Este trabalho recebeu apoio financeiro através de bolsa de mestrado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 00/01322-1.

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Panorama da tuberculose no cenário internacional	18
1.2. Mecanismos de resistência de <i>M. tuberculosis</i> à isoniazida.....	19
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Período do estudo	28
3.2. Desenho do estudo	28
3.3. Obtenção das micobactérias	28
3.4. Extração do DNA genômico das cepas recuperadas	29
3.5. Reação em Cadeia da Polimerase	30
3.6. Polimorfismo de Conformação de Cadeia Única	32
3.7. Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (Southern Blot)	33
3.7.1. Digestão de DNA cromossômico pela <i>Pvu</i> II	35
3.7.2. O gel para o Southern Blot	36
3.7.3. Hibridização e detecção do Southern Blot	36
3.8. Sequenciamento	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Sensibilidade a outros quimioterápicos	41

4.2. PCR e SSCP	41
4.3. RFLP	44
4.4. Sequenciamento	46
5. DISCUSSÃO	48
5.1. Triagem das cepas	49
5.2. SSCP	49
5.3. Abordagem molecular de tipagem de micobactérias	50
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS.....	59
8. PUBLICAÇÃO	70

Lista de Siglas e Abreviaturas

AhpC	Alquil-hidroperóxido redutase
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
BCG	“bacille Calmette-Guerin”
CTAB	N-cetil-N, N, N, - trimetil-amôniobromida
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
DNTP	Bases nitrogenadas
DOT	Tratamento diretamente observado
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ETB	Etambutol
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H37Rv	Cepa padrão de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IAL	Instituto Adolfo Lutz
Ile	Isoleucina
INH	Isoniazida
InhA	Gene que participa na codificação do ácido micólico
INHr	Resistente à isoniazida
INHs	Sensível à isoniazida
IS	Seqüências de inserção
IS6110	Seqüência de inserção 6110
IUATLD	International Union Against Tuberculosis and Lung Disease
KasA	Beta-ketoacil ACP sintase
KatG	Gene que codifica a enzima catalase-peroxidase
KatG315	Códon 315 do gene <i>katG</i>
KatG315Ser	Aminoácido serina no códon 315 do gene <i>katG</i>
KatG463	Códon 463 do gene <i>katG</i>
KatG463Arg	Aminoácido arginina no códon 463 do gene <i>katG</i>

KatG463Leu	Aminoácido Leucina no códon 463 do gene <i>katG</i>
KCl	Cloreto de potássio
Leu	Leucina
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. intracelulare</i>	<i>Mycobacterium intracelulare</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR	Multidroga-resistente
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MIC	Concentração inibitória mínima
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OxyR	Enzima bacteriana
Pb	Pares de bases
PCR	“Polymerase chain reaction”
Pvu II	Enzima de restrição obtida da bactéria <i>Proteus vulgaris</i>
PZA	Pirazinamida
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
RIF	Rifampicina
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
Ser315	Aminoácido serina no códon 315
Ser315Thr	Substituição de serina por treonina no códon 315
SM	Estreptomicina
SSCP	“Single Strand Conformation Polymorphism”
<i>Taq</i> polimerase	Polimerase obtida da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tuberculose
TE	Tris/HCl/EDTA
Thr	Treonina
U-V	Ultravioleta

		Página
Figura 1.	Fotos mostrando gel de poliacrilamida utilizados para realização de SSCP.	42
Figura 2.	Padrões de SSCP de produtos de PCR dos genes <i>katG</i> e <i>rpoB</i> de cepas de <i>M. tuberculosis</i> .	43
Figura 3.	Exemplo de gel para Southern Blot / RFLP utilizado na genotipagem de micobactérias.	44
Figura 4.	Dendrograma baseado em RFLP- <i>IS6110</i> de 85 cepas selecionadas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	45
Figura 5.	Cromatograma de sequenciamento da cepa 15.	46
Tabela 1.	Sensibilidade aos antimicrobianos de 91 cepas de <i>M. tuberculosis</i> isoladas entre 1999-2000 em São Paulo.	47
Tabela 2.	Distribuição das cepas de acordo com a mutação encontrada no códon 315 do gene <i>katG</i> e seus perfis de sensibilidade às drogas correspondentes.	47

RESUMO

Isoniazida, rifampicina e pirazinamida têm sido usadas como a base do tratamento da tuberculose no Brasil e na maioria dos países do mundo. O fenômeno da resistência bacteriana aos agentes quimioterápicos tem sido descrito desde que seu uso foi instituído. No caso da tuberculose, houve aumento expressivo do número de cepas resistentes, principalmente na década de 1990, devido à desestruturação dos serviços de vigilância e controle da doença e, também, à pandemia da AIDS. A resistência a antimicrobianos em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resulta em aumento da morbi-mortalidade e maiores custos para o serviço de saúde. A mutação no códon 315 do gene *katG*, responsável pela codificação da enzima catalase-peroxidase em *M. tuberculosis*, é um dos mecanismos de resistência desta bactéria à isoniazida.

Para caracterizar as bases genéticas da resistência a drogas em cepas de *M. tuberculosis* no estado de São Paulo, foram selecionadas para estudo 91 amostras resistentes e 4 sensíveis à isoniazida. Essas cepas foram obtidas de culturas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz central, em São Paulo, para identificação e realização de teste de sensibilidade a drogas. Um total de 467 cepas foram recebidas no período de agosto de 1999 a setembro de 2000. A genotipagem, utilizando a técnica de RFLP, foi realizada para o estabelecimento de parentesco entre as cepas. Estudos com as técnicas de SSCP e sequenciamento de fragmento contendo o códon 315, amplificado do gene *katG*, foram realizados para triagem e confirmação de mutações associadas à resistência à isoniazida.

A associação de resistência à isoniazida e rifampicina foi encontrada em 74,8% das cepas testadas. Resistência à isoniazida/pirazinamida e isoniazida/etambutol foi encontrada em 33 e 9,9%, respectivamente. Resistência concomitante a todas as drogas consideradas de primeira linha para o tratamento da tuberculose (isoniazida, rifampicina e pirazinamida) foi encontrada em 23,1% das cepas. A genotipagem mostrou padrão heterogêneo de bandas, com formação de oito agrupamentos com apenas duas amostras cada. A substituição AGC→ACC (Serina→Tirosina) foi a mutação mais encontrada (48%). Não foram encontradas mutações em 39,5% das cepas resistentes estudadas e nos restantes 12,5% foram detectadas outras mutações.

Conclui-se que no estado de São Paulo a resistência à rifampicina é freqüente entre as cepas resistentes à isoniazida. A resistência às três principais drogas para o tratamento da tuberculose também ocorreu em alta freqüência. A substituição AGC→ACC foi a mutação mais encontrada, porém uma grande parte das cepas resistentes não apresentavam tais mutações. Pelos dados levantados, podemos também inferir que o fenômeno da resistência do *M. tuberculosis* a drogas não é, em São Paulo, uma consequência de disseminação clonal das cepas, mas casos isolados, provavelmente secundários a irregularidades no tratamento. Este trabalho, quando do seu início, foi um dos primeiros a endereçar a questão das bases genéticas para resistência a drogas em *M. tuberculosis* no Brasil, e estudos mais sistemáticos e abrangentes são necessários para melhor compreensão desta dinâmica em nosso meio.

ABSTRACT

Isoniazid, rifampin and pirazinamide have been used as the Standard treatment for tuberculosis in Brazil and most countries around the world. Antimicrobial resistance has been described since its use was instituted. As for tuberculosis, there has been an expressive rise in multidrug resistant strains in the decade of 1990, due mainly to the dismantling of tuberculosis vigilance programs and the AIDS pandemics. Antimicrobial resistance among *Mycobacterium tuberculosis* strains result in increase in morbidity and mortality and cost for health care. Mutations in codon 315 of the *katG* gene, responsible for coding catalase-oxidase in *M. tuberculosis*, has been associated as one of the key mechanisms of resistance of this bacteria to isoniazid. In Brazil, studies towards the molecular mechanisms involved in this process are still on its beginning.

To characterize the genetic basis of *M. tuberculosis* drug resistance in the state of São Paulo, 91 isoniazid resistant and 4 isoniazid sensitive strains were selected for study. These strains were drawn from samples (462 strains) sent to the Instituto Adolfo Lutz central laboratory in São Paulo for identification and drug susceptibility tests. The study period was from august 1999 through september 2000.

Genotyping of mycobacterium was performed using RFLP technique. SSCP study and sequencing of the amplified fragment of *katG* gene that contained codon 315 were performed to screen and check for mutations conferring resistance to isoniazid.

Concomitant resistance to isoniazid and rifampin was found in 74,8% of strains tested. Resistance to both isoniazid/rifampin and isoniazid/ethambutol was found in 33 and 9,9%, respectively. Concomitant resistance to all drugs considered as first line treatment of tuberculosis (isoniazid, rifampin and pirazinamid) was found in 23,1% of strains. Genotypic studies revealed a heterogeneous band pattern, with formation of 8 clusters with only two specimens each. The most prevalent substitution was AGC→ACC (Ser→Thr), found in 48% of strains. No mutation was noted in 39,5% of resistant strains studied, and the remaining 12,5% harbored other less frequent mutations.

In conclusion, resistance to rifampin is a frequent event among isoniazid resistant strains collected in Sao Paulo, Brazil. Resistance to the three front drugs used for the treatment of tuberculosis also occurred in high frequency. The AGC→ACC substitution was the most frequent mutation found, although a high percentage of strains did not carry any mutation.

Data also suggests that the phenomenon of *M. tuberculosis* resistance in São Paulo is not due to clonal dissemination of strains, but rather the rise of isolated cases as a probable consequence of irregular treatment. This work is characterized as one of the first to address the genetic basis of drug resistance in *M. tuberculosis* in Brazil, and more systematic and comprehensive studies are necessary to establish the dynamics of such disease in our setting.

INTRODUÇÃO

1.1. Panorama da tuberculose no cenário internacional

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e sua distribuição é mundial. Sua disseminação acompanhou o desenvolvimento dos grandes centros urbanos e dos aglomerados populacionais. No início do século a doença alcançou grandes proporções em diversas partes do globo e seu controle só foi possível com a identificação de seu modo de transmissão e pela produção de drogas eficazes para o seu tratamento. Houve, a partir de então, um período de declínio acentuado em sua incidência chegando, em países desenvolvidos, a ser considerada a sua erradicação ao redor do fim do século XX. Com a diminuição do número de casos nesses países, houve uma paulatina desestruturação dos órgãos de vigilância. A noção de que a doença não mais representava um risco para a saúde pública levou o controle da tuberculose (TB) a ser negligenciado (RAVIGLIONE, 2002). A ausência de medidas para o controle adequado da transmissão, o uso indiscriminado de tuberculostáticos e, finalmente, a recente pandemia de AIDS, contribuíram para o seu ressurgimento na década de 1990. A emergência de cepas de *M. tuberculosis* resistentes às drogas consideradas de primeira linha para o tratamento da tuberculose é um dos maiores desafios da atualidade. No Brasil, a falta de uma política sanitária adequada, o descontrole da epidemia de AIDS, a crescente urbanização da população e as suas baixas condições sócio-econômicas, fazem com que o problema da tuberculose alcance proporções ainda maiores.

Assim sendo, a tuberculose continua como uma das principais causas de morte dentre as doenças infecciosas no mundo tendo havido, inclusive, um aumento global no número de casos novos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003; KOCHI *et al*, 1993), estima-se que oito milhões de casos novos e três milhões de óbitos por tuberculose ocorram por ano no mundo. Devido a essas cifras alarmantes a organização mundial da saúde (OMS) declarou-a como uma emergência mundial, desenvolveu programas mais eficazes de controle e estabeleceu as diretrizes para o tratamento diretamente observado (DOT). Infelizmente, nos países em desenvolvimento, tais estratégias encontram inúmeras barreiras e dificuldades para sua implementação e, até o ano 2000, apenas 7% da população brasileira estava sob a cobertura do “DOT” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

os produtos destes genes e suas relações com processos metabólicos e sítios de ação das drogas.

A enzima catalase-peroxidase da *M. tuberculosis*, produto de transcrição do gene *katG*, é uma proteína de 80 kD, com grande homologia com a hidroperoxidase I de *E. coli* e as catalase-peroxidases de *M. intracelulare* e de outras bactérias (MORRIS *et al*, 1992). Nessas bactérias, essas enzimas já haviam sido estudadas e seu modo e sítio de ação mais bem caracterizados. Esse fato possibilitou estabelecer-se correlação com seu modo de ação em *M. tuberculosis*.

Estudos realizados com *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* resistentes à INH, nos quais o gene *katG* mutante foi substituído pelo gene selvagem, a sensibilidade à INH foi restabelecida (ZHANG *et al*, 1993). Esse resultado confirma que a proteína codificada pelo *katG* participa do processo de resistência à INH. A avaliação de que duas entre três cepas altamente resistentes à INH mostraram deleções completas do gene *katG* (ZHANG *et al*, 1992), levou à suposição de que este seria o mecanismo mais importante no desenvolvimento de resistência a droga. Entretanto, estudos posteriores evidenciaram que apenas pequena parte das bactérias resistentes coletadas de várias localidades apresentava tais deleções e que, de fato, muitas apresentavam genes aparentemente intactos, embora a atividade da catalase se apresentasse bastante diminuída na maioria desses organismos (STOECKLE *et al*, 1993; ALTAMIRANO *et al*, 1994; GOTO *et al*, 1995; COCKERILL *et al*, 1995; HEYM *et al*, 1995; MUSSER *et al*, 1996; HAAS *et al*, 1997; DOBNER *et al*, 1997; PRETORIUS *et al*, 1995; VICTOR *et al*, 1996; MARTTILA *et al*, 1996; ROUSE *et al*, 1995; FERRAZOLI *et al*, 1995).

A observação de que a maioria das cepas INHr não apresentavam deleções grosseiras em *katG* estimularam uma análise mais precisa da estrutura deste gene nestas micobactérias. Investigadores de todo o mundo relataram que 50 a 60 % das cepas INHr têm pequenas mutações, deleções ou inserções que não estão presentes nos isolados sensíveis à INH (MUSSER, 1995).

Embora a gama de alterações e mutações presentes em organismos resistentes à INH seja bastante grande, a mais freqüente é a substituição de um aminoácido localizado na posição 315Ser. Musser *et al*. (MUSSER *et al*, 1996) estudaram 85 cepas INHr de fontes diversas, não relacionadas epidemiologicamente, e identificaram mudanças no aminoácido

315Ser em 49 (58%) delas. A maioria tinha uma substituição no aminoácido Ser315Thr. De maneira análoga, Haas e colaboradores (HAAS *et al*, 1997) determinaram que 68% das cepas INHr provenientes da África tinham alterações no códon 315, predominantemente substituições Ser315Thr. Ainda, Dobner e colaboradores (DOBNER *et al*, 1997) mostraram que 26 entre 27 cepas INHr isoladas na Alemanha e Serra Leoa tinham mutações no códon 315.

Três estudos não confirmaram a presença de substituições em *katG*315Ser em grande frequência. Pretorius e colaboradores (PRETORIUS *et al*, 1995) não acharam tais alterações numa amostra de 39 cepas isoladas da África do Sul, USA e Suíça. Entretanto, houve retratação deste trabalho logo após sua publicação, pois foi identificado que a técnica de PCR-SSCP, utilizada para identificação de cepas resistentes, falhou em polimorfismos presentes no códon 315 em 13 de 39 (33 %) dos organismos (VICTOR *et al*, 1996). Marttila e colaboradores (MARTTILA *et al*, 1996) estudaram 54 isolados INHr provenientes de pacientes da Finlândia e identificaram somente 4 organismos com substituições Ser315. A razão para a baixa frequência de substituições *katG*315 neste estudo ainda não foi satisfatoriamente explicada. Rouse *et al* (1995) analisaram 26 cepas INHr provenientes da Coreia do Sul e EUA e identificaram apenas um isolado com substituição Ser315. Uma explicação possível é que a amostra incluía grande número de cepas com MICs (concentração inibitória mínima) muito baixos para a INH (1-2 ug/ml).

Uma explicação plausível para a maior frequência de mutações envolvendo aminoácidos *katG*315 na maioria das cepas INHr, pode ser inferida a partir de dados publicados por Wengenack e colaboradores (WENGENACK *et al*, 1997). Eles estudaram as propriedades enzimáticas de proteínas selvagens purificadas e mutantes Ser315Thr obtidas a partir de *E. coli*. Comparada com a atividade da proteína *katG* selvagem, a atividade da catalase do mutante Ser315Thr estava reduzida em seis vezes, e a atividade da peroxidase menos que duas vezes. As proteínas mutantes e as selvagens tinham, cada qual, um grupo heme por subunidade. Esse resultado indica que a diferença na atividade enzimática do mutante Ser315Thr não estava relacionada à incorporação incompleta do cofator heme (indispensável para ação da enzima) na *E. coli* hospedeira. A proteína *katG* selvagem era mais eficiente que a enzima mutante na capacidade de converter a INH prodroga em INH ativa (ácido isonicotínico). Em conjunto, esses estudos evidenciam que a

enzima catalase-peroxidase produzida pelos mutantes Ser315Thr são enzimas relativamente competentes com uma baixa capacidade de oxidação da INH, dessa forma mostrando um aparente equilíbrio entre a ação da peroxidase necessária para a detoxificação de radicais normalmente produzidos pela bactéria e a reduzida capacidade de conversão da pró-droga em INH, ativada pela catalase, processo este que, em condições normais, a levaria à morte diante da INH.

O polimorfismo mais freqüentemente encontrado no gene *katG* é a substituição CGG > CTG levando à substituição dos aminoácidos Arg > Leu na posição 463 (MUSSER, 1995; COCKERILL *et al*, 1995; JOHNSON *et al*, 1997). Em análises preliminares sugeriu-se que as substituições no códon *katG*463 estariam eventualmente envolvidas na resistência à INH (COCKERILL *et al*, 1995), porém, análises subsequentes mostraram que a maioria das amostras com estas substituições apresentavam também outras alterações em *katG* e que, portanto, aquele era apenas um marcador eventual presente em cepas resistentes à INH (HEYM *et al*, 1995) e, de fato, cepas com mutações apenas em *katG*463 tinham níveis comparáveis de atividade da catalase-peroxidase às das cepas selvagens (HEYM *et al*, 1995; LEE *et al*, 1997; JOHNSON *et al*, 1997). Mutagêneses direcionadas ao códon 463 de Leu por Arg mostraram que não havia alterações na atividade da catalase-peroxidase (ROUSE *et al*, 1996) e que esta substituição está presente em muitas cepas sensíveis a INH (INHs) recuperadas em várias partes do mundo (JOHNSON *et al*, 1997). Estudos detalhados de cinética enzimática não foram capazes de demonstrar diferenças entre as atividades de *katG*463Leu e *katG*463Arg e ambas oxidam INH em ácido isonicotínico.

Há, entretanto, dados obtidos a partir de cepas isogênicas de BCG (bacille Calmette-Guérin), modificadas para apresentar *katG*463Leu ou 463Arg, que mostram uma aparente diferença entre as proteínas sintetizadas (ROUSE *et al*, 1996), sendo o MIC para INH na *katG*463Leu ligeiramente maior do que na *katG*463Arg (1.0 µg/ml e 0.5 µg/ml, respectivamente). Esses resultados são compatíveis com o fato de que o *M. bovis*, que naturalmente possui *katG*463Leu (DOBNER *et al*, 1997; SREEVATSAN *et al*, 1997), é ligeiramente menos sensível à INH que o *M. tuberculosis*. Associado a isso, das 14 cepas isoladas por Rouse e colaboradores (ROUSE *et al*, 1996) com baixa resistência à INH e

atividade mantida da catalase, nove apresentavam *katG*463Leu e nenhum organismo tinha outras mutações em *katG* ou *inhA*.

Rouse *et al* (1996), usando mutagênese sítio dirigida, alteraram o gene *katG* selvagem de *M. tuberculosis* em treze códons previamente descritos e relacionados à resistência à INH. Os efeitos destas mudanças na sensibilidade à INH foram determinadas por ensaios complementares em cepas INHr de *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG. Dessa maneira, 9 de 13 mutações conferiram resistência à INH, incluindo Arg104Leu, His108Gln, Asn138Ser, Leu148Arg, His270Gln, Thr275Pro, Ser315Thr, Trp321Gli e Asp381Gli. Estes resultados são condizentes com os modelos de estudo, que sugerem que os resíduos 104 e 108 estão localizados no sítio catalítico da enzima, ou perto dele, e que os resíduos 270, 275 e 315 participam na ligação ao heme (LOEWEN *et al*, 1990; PELLETIER & KRAUT, 1992).

Apesar da forte correlação encontrada entre mutações em *katG* e resistência a INH, em vários isolados não foi possível evidenciar tais mutações. Dessa forma, outros genes também foram identificados e relacionados à resistência à INH, atuando em associação ao *katG* ou isoladamente. São eles *inhA*, *kasA*, e região intergênica *oxyR- ahpC*.

InhA - Foi demonstrado que o gene *inhA* participa da síntese de ácido micólico, que compõe a parede bacteriana (BANERJEE *et al*, 1994). A INH, ativada pela catalase-peroxidase, liga-se ao complexo NADH-enoyl-redutase, do qual o produto do gene *inhA* é dependente, dessa forma inativando-o e inibindo a biossíntese de ácido micólico (BASSO *et al*, 1998). Mutações encontradas neste gene produzem um aumento na expressão deste gene, aumentando o alvo para atuação da droga, e dessa maneira produzindo resistência através de um mecanismo de titulação.

KasA - Mdluli *et al* (1998) mostraram que, em resposta ao tratamento com INH, ocorria um acúmulo de uma proteína de 12KDa conhecida como AcpM. De maneira análoga, uma outra proteína com o mesmo aminoácido terminal que a AcpM, mas com uma massa molecular de 80KDa, também foi identificada nestas mesmas condições. Análise desta proteína evidenciou um complexo covalente composto por INH, AcpM e β -ketoacyl ACP synthase, denominada *kasA*. Análise da sequência de DNA de *kasA* de cepas resistentes à INH que não apresentavam mutações em *katG* e *inhA* mostraram alterações em quatro posições de aminoácidos, sendo que cepas sensíveis não apresentavam tais

mutações. Esses resultados indicaram que esse é um possível local envolvido em mecanismo de resistência à INH.

OxyR- *ahpC* – Em enterobactérias como *E. coli* e *S. typhimurium* o gene *katG* é regulado pelo gene *oxyR* em resposta a processos oxidativos induzidos pela presença de H_2O_2 . OxyR ainda regula outros genes como *ahpC*, que codifica a produção de uma pequena subunidade da enzima álcool-hioperóxido redutase (FARR & KOGOMA, 1991). Mutações tanto em *oxyR* quanto em *ahpC* em *E. coli* conferem sensibilidade à INH a essas bactérias que normalmente são resistentes a essa droga (ROSNER, 1993). A partir de biblioteca de genes feitas a partir da cepa padrão H37Rv, descobriu-se que o gene *oxyR* estava inativado devido a diversas mutações e deleções. Estas alterações também estavam presentes em outros membros do complexo *M. tuberculosis*, entretanto, um gene *oxyR* intacto foi descoberto 109pb acima de *ahpC* em *Mycobacterium leprae* (DERETIC *et al*, 1995). A transformação da região *oxyR-ahpC* de *M. leprae* em *M. tuberculosis* resultou em resistência à INH. Dessa forma interpretou-se que a sensibilidade à INH em *M. tuberculosis* pode ser em parte devido a inativação de *oxyR*. Mutações em outras regiões, como a região promotora de *ahpC*, podem resultar em aumento da expressão desses genes, como uma compensação pela inativação de *oxyR*.

Mutações nesses outros sítios ocorrem em menor frequência. Embora relevantes para uma avaliação abrangente, não serão tema deste estudo.

Desta forma, podemos identificar alguns fatores que tornam relevante o estudo molecular dos genes relacionados ao desenvolvimento de resistência às drogas pelo bacilo da tuberculose, em especial à INH, por ser esta encontrada em maior frequência entre as drogas de primeira linha:

- A possibilidade de desenvolvimento de drogas de uma maneira mais racional e dirigida a seus locais de ação determinados por análise molecular.
- Desenvolvimento de técnicas mais sensíveis que possam, rápida e inequivocamente, identificar cepas resistentes e, dessa maneira, otimizar e aprimorar o tratamento da doença.
- Ter dados locais acerca do padrão e da frequência de *M. tuberculosis* resistentes à INH.

OBJETIVOS

- Detectar agrupamentos genotípicos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à isoniazida.
- Caracterizar mutações no códon 315 do gene *katG* de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à isoniazida.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Período do estudo

De agosto 1999 a setembro 2000.

3.2. Desenho do estudo

Descritivo.

3.3. Obtenção das micobactérias

As cepas utilizadas neste estudo foram aleatoriamente selecionadas a partir de um total de 463 isolados de espécimes clínicos, resistentes a isoniazida, coletadas no período entre agosto de 1999 a setembro de 2000 principalmente na cidade de São Paulo, mas também provenientes de outras localidades, pelo Instituto Adolfo Lutz Central, em São Paulo, pelo setor de micobactérias. Dessas, foram estudados 86 isolados. Os critérios para envio das cepas ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) para testes de sensibilidade são: co-infecção HIV-TB; falência de tratamento; re-tratamento e suspeita de resistência às drogas. Embora estes critérios tenham sido estabelecidos de longa data, foi só a partir de 2001 que passaram a realmente ser exigidos. A resistência a isoniazida (INH), rifampicina (RIF), estreptomicina (STM) e etambutol (ETB) foi determinada pelo método da razão de resistência (COLLINS *et al*, 1997). As concentrações das drogas usadas eram de 0,05 a 0,2 µg/ml para INH, 2,5 a 10 µg/ml para RIF, 0,62 a 2,5 µg/ml para ETB e 3,12 a 12,5 µg/ml para STM. Resistência a pirazinamida (PZA) foi determinada pelo teste de atividade da pirazinamidase usando a concentração de 100 µg/ml. Ainda uma cepa sensível proveniente do IAL foi incluída no estudo.

Oito outras cepas foram estudadas, cinco resistentes e três sensíveis à INH, provenientes do laboratório de Patologia Clínica, setor de micobactérias, do Hospital das Clínicas da Unicamp. A determinação da resistência à drogas nesses casos foi feita através de técnica padronizada, pelo equipamento BACTEC 460 radiométrico.

Para os padrões internacionais, foram consideradas amostras multiresistentes (MDR) aquelas resistentes a pelo menos INH e RMP. No Brasil, são consideradas cepas MDR àquelas resistentes à INH, RMP e mais uma terceira droga de primeira linha.

Estudamos, portanto 91 isolados resistentes e quatro sensíveis à isoniazida, provenientes dos dois locais mencionados.

Considerando-se que a incidência de tuberculose em 2002 no estado foi de 15.792 casos (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2002), o número esperado de cepas resistentes à isoniazida no mesmo período seria de 950 casos. Nossa amostra representaria, de maneira geral, aproximadamente 9,5% dos casos.

As cepas que obtiveram crescimento satisfatório em meio de Löwenstein-Jensen foram armazenadas para posterior utilização em nosso laboratório através de congelamento. Para tanto, duas ou três alças de semeadura são adicionadas a 1 ml de solução de Sauton e misturadas vigorosamente. Este conteúdo é então adicionado a um tubo com rosca, específico para congelamento, que contém de 20 a 30 pérolas de vidro (utilizamos miçangas de vidro, pois através do uso mostraram-se adequadas para tal). O excesso é desprezado e então os tubos são congelados à -20° ou -70° C. Essa técnica garante as qualidades fenotípicas dos isolados, já que não há passagens sucessivas para a sua conservação e sim a ressemeadura a partir de um lote “semente”. Para essa ressemeadura, toma-se uma ou duas pérolas, em laboratório de nível II de biosegurança (AMERICAN THORACIC SOCIETY/CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1990) e, com ajuda de uma alça de semeadura, rolam-se as pérolas na superfície de meio de cultura de Löwenstein-Jensen contido em tubo específico para cultura de micobactérias. A seguir os tubos são mantidos a 37° C durante cerca de 30 dias até um crescimento adequado.

3.4. Extração do DNA genômico das cepas recuperadas.

O primeiro estágio na extração do DNA genômico de *Mycobacterium tuberculosis* foi realizado no Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, até a fase de desproteinização com clorofórmio/álcool isoamílico.

Após a recuperação das micobactérias dos meios de cultura de Löwenstein-Jensen, semeados a partir das cepas congeladas nas pérolas, são coletadas o equivalente a duas alças para inoculação e adicionados a 600µl de água estéril. São então aquecidas por 20 minutos a 80° C em banho maria para que haja a morte celular. Após resfriamento em temperatura ambiente, faz-se a centrifugação por cinco minutos, despreza-se o sobrenadante e acrescenta-se 400µl de TE pH 8,0. A esse produto é adicionado 50µl de

lisozima (10mg/ml) e deixado até o dia seguinte em agitador com aquecimento a 37°C para digestão da parede celular. No dia seguinte são adicionados 70µl de SDS (10%) e 5µl de proteinase K (10mg/ml), homogeneiza-se a amostra que então é incubada por 10 minutos a 65°C em agitador com aquecimento, para que haja a lise complementar da parede e das proteínas bacterianas. São então adicionados 100µl de NaCl 5M e 100µl de CTAB/NaCl, pré aquecidos à 65°C, incubando-se novamente por 10 minutos à 65°C, também em agitação com aquecimento. A seguir, adicionamos 700µl de clorofórmio/álcool isoamílico, que são solventes naturais, e centrifugamos os microtubos por dez minutos a 12.000 rpm, para que haja a desproteínização da amostra e a separação da fase aquosa, onde está contido o DNA. Transfere-se então esta fase aquosa, o sobrenadante, para outro microtubo e acrescenta-se 450µl de isopropanol para a precipitação do DNA. A amostra então é deixada até o dia seguinte à -20°C. Centrifuga-se a amostra por 5 minutos a 12.000 rpm e adiciona-se 1 ml de etanol 70% gelado para que se retire o excesso de sal. Descartamos o sobrenadante e deixamos secar a temperatura ambiente, após o que acrescentamos de 30 a 50µl de TE pH 8,0, que é um agente quelante com pH ideal, para que não haja degradação do DNA. Após 24 horas à temperatura de 4°C fazemos a quantificação de DNA para cada amostra, através do espectrofotômetro de luz UV (Gene Quant, Pharmacia). Se há quantidade suficiente de DNA na amostra (>350 µg/µl), realizamos análise por eletroforese (70v por 45 minutos) em gel de agarose a 0,8% com brometo de etídio (0,5µg/ml) para a visualização, imersos em tampão TBE pH 8,0, sendo a visualização feita através de transiluminador de luz UV. Este processo é feito para se observar a integridade do DNA extraído. As fotografias foram tiradas com câmera Polaroid. A partir deste ponto a amostra pode ser estocada congelada a -20° ou -70°C até que venha a ser utilizada novamente (VAN SOOLINGEN *et al*, 1994).

3.5. Reação em Cadeia da Polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica empregada para a obtenção de um determinado fragmento de DNA, que se pretende estudar. Para tal é necessário a utilização de além do DNA alvo, pelo menos um par de iniciadores, que são complementares aos terminais 5' e 3' da região a ser amplificada; oligonucleotídeos para a

síntese de material genético; $MgCl_2$, um quelante para as pontes de hidrogênio entre os oligonucleotídeos; e uma polimerase termoestável capaz de se manter ativa após os repetidos ciclos, chamada *Taq* polimerase, devido à sua origem da bactéria *Thermus aquaticus* (DELIDOW *et al.*, 1996). Este processo se dá através de três passos básicos necessários a qualquer síntese de DNA, que são:

- a) Desnaturação: no qual o DNA alvo é submetido a altas temperaturas para que haja a separação da fita dupla original em duas fitas únicas e para se eliminar sua estrutura secundária, a conformação espacial que estas fitas tendem a adquirir devido às ligações de hidrogênio entre as bases. Esta desnaturação em geral é obtida com temperaturas de 94°C, que duram de 1 a 2 minutos, sendo que a desnaturação inicial deve durar aproximadamente 5 minutos.
- b) Anelamento: onde ocorre a hibridização dos iniciadores ao DNA alvo. A temperatura a ser utilizada nesta fase varia de acordo a especificidade desejada. Quanto maior a temperatura, maior a especificidade das ligações dos iniciadores ao DNA alvo e, portanto, menor a quantidade de fragmentos inespecíficos amplificados. Reações usuais utilizam temperaturas de 55 a 59°C por 1 a 2 minutos, sendo que podem chegar até 65°C ou mais.
- c) Extensão: onde ocorre a síntese das novas fitas de DNA. Este passo em geral é realizado a 72°C, que é ideal para a atividade da *Taq* polimerase. O tempo necessário é determinado pelo tamanho da sequência a ser amplificada.

A técnica de PCR foi empregada para a amplificação de determinada região do gene *katG*, para que este produto pudesse ser utilizado na realização do SSCP (Single Strand Conformation Polymorfism) e para o seu sequenciamento, a fim de levar a cabo os objetivos do projeto.

Baseado em protocolo proposto por Altamirano e colegas (ALTAMIRANO *et al.*, 1994), o PCR foi realizado para um volume de reação de 50µl contendo (concentrações finais): 2,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10mM TRIS-HCl (pH 8,3), 200mM de cada uma dos quatro dNTPs, 320 nM de cada iniciador (*katg* 1 e *katg* 2), DNA fonte na concentração de 1ng/µl, utilizando-se 5µl da solução, e 1,5 unidades de *Taq* polimerase. A amplificação foi

realizada em termociclador por 35 ciclos, com desnaturação a 94°C por 1,5 minutos, anelamento a 59°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto.

O produto da amplificação foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio na concentração de 0,5µg/µl.

3.6. Polimorfismo de Conformação de Cadeia Única

O desenvolvimento da técnica de “Single Strand Conformation Polymorfism” (SSCP), se baseou na observação de que toda molécula possui uma conformação espacial característica. No caso das cadeias de DNA é relativamente estável sua conformação helicoidal e alongada. Quando há, entretanto, a desnaturação da fita dupla de DNA em duas cadeias únicas através do calor, elas adquirem uma conformação característica, de acordo com a natureza de suas seqüências (ORITA *et al*, 1989). Se há a mudança de apenas um desses nucleotídeos, há alteração na conformação espacial desta cadeia. Ocorre, portanto, que a velocidade que esta molécula terá ao migrar através de um gel de poliacrilamida sofrerá variação, quando submetido à eletroforese. A diferença no padrão de migração das bandas pode, portanto, indicar a presença de mutações, sendo uma técnica útil para triagem e posterior caracterização destas (ORITA *et al*, 1989; HONGYO *et al*, 1993; SHEFFIELD 1993).

Há três fatores básicos que influenciam na migração de uma molécula através do gel de poliacrilamida: a densidade da matriz que compõe o gel; a carga iônica do tampão; e a temperatura durante a eletroforese. Dessa maneira, para cada sequência amplificada, haverá uma condição de pH e temperatura ideal para sua realização. Foi utilizado nessa fase um método comercial disponível (GeneGel SSCP Starter Kit, Amersham Pharmacia biotech), onde são testados três pHs diferentes (7,4, 8,3 e 9,0) para três temperaturas diferentes (5, 12 e 20°C), para padronização da técnica. Uma vez padronizada, então realiza-se o SSCP para todas as amostras. Utiliza-se gel de poliacrilamida 15/24, iniciando-se pela hidratação do gel com o tampão fornecido no kit por pelo menos uma hora. As amostras de DNA são misturadas à solução de detecção (95% formamida; 2,5% xylene cyanol a 1%; e 2,5% azul de bromofenol a 1%), na concentração de 1 ng/µl num total de 6µl de solução, na relação de volume 1:1. Realiza-se desnaturação das amostras por 3 a 5 min a 95°C, depois

resfriando-as em gelo. O gel re-hidratado é então colocado na unidade de eletroforese (GenePhor, APB), são posicionados os filtros utilizados como eletrodos, devidamente umedecidos com as soluções específicas para o ânodo e cátodo. As amostras são então colocadas nos poços do gel para a eletroforese, seguindo-se as especificações de tempo e temperatura previamente estabelecidas. Após eletroforese o gel é corado pela prata para visualização das amostras.

3.7. Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (Southern Blot)

A técnica de “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) vem sendo empregada com sucesso no estudo e na genotipagem de micobactérias, e se baseia em um ponto fundamental da genética destas bactérias. A presença de elementos que se repetem, em frequência variável, ao longo do genoma micobacteriano, sendo chamado de transposons (MCADAM *et al*, 2000). Os transposons são elementos de DNA que tem a capacidade de “pular” de um segmento do genoma a outro. Isso ocorre tipicamente de um modo aleatório, sendo que o mutante originado por essa recombinação pode ser viável, levando à expressão de um novo fenótipo, como também pode ser letal à bactéria, já que essa transposição pode ocorrer no meio de um gene, dessa maneira inativando-o. Esses transposons podem ser marcados com uma sequência específica de pares de base, dessa maneira tornando fácil sua identificação. Através da determinação dos locais de inserção desses transposons e dos fenótipos específicos surgidos, é possível o estudo e a caracterização dos genes em questão.

A descoberta do primeiro elemento transponível de DNA de uma micobactéria se deu em 1987. Desde então já foram descritos 46 elementos de inserção, em 10 espécies de micobactérias. Desses, apenas 6 se mostraram ativos e com capacidade de se transpor de um local do DNA da bactéria para outro. São identificados pela sigla “IS” (Insertion sequences) e são subdivididos em famílias, de acordo com características e espécies onde foram identificadas. Como alguns elementos de inserção são muito específicos de cada espécie, podem e tem sido usados para identificação e tipagem de micobactérias, inclusive na prática clínica.

O uso de transposons caracteriza uma das maneiras mais eficazes de genotipagem de micobactérias. Para que se determine se uma cepa de micobactéria é relacionada à outra determinada cepa, é necessário o estudo de seu genótipo. Essa correlação entre cepas distintas tem muita importância em estudos epidemiológicos de surtos e disseminação de doenças, sendo que a partir desses estudos podem ser instituídas medidas para sua contenção, uma vez que o processo de disseminação pode ser mais bem compreendido. Como os transposons são fragmentos de DNA que, de uma forma geral, se relocam dentro do genoma de uma bactéria de maneira aleatória, o estudo das diferenças entre a localização desses transposons podem nos dizer o quão distantes duas ou mais cepas estão filogeneticamente. Para que sejam de utilidade na genotipagem de micobactérias, esses transposons devem ocorrer em alta frequência dentro daquela determinada espécie, ter baixa especificidade de local de inserção dentro do genoma da micobactéria e um método eficaz para sua detecção. No caso de *M. tuberculosis* o IS6110 é o que melhor representa estas características. Elementos da classe I, do qual IS6110 faz parte, não possuem atividade definida, apenas a de catalizar sua própria transposição. Através da técnica de Southern Blot é possível a detecção do número e dos locais de inserção destes elementos. Como ao longo do processo de replicação do *M. tuberculosis* essas transposições e deleções ocorrem aleatoriamente, é possível estabelecer a origem filogenética entre cepas de interesse clínico e epidemiológico. Para tanto, foi fundamental o desenvolvimento de uma ferramenta importantíssima no manuseio e manipulação do genoma bacteriano, que foi a utilização de enzimas de restrição (SMITH, 1996). Endonucleases de restrição são enzimas bacterianas capazes de clivar fitas duplas de DNA em sequências alvo específicas, com a produção de fragmentos de tamanho variável. A nomenclatura se baseia nas iniciais das bactérias das quais foram isoladas tais enzimas e utilizamos para nossos fins a *Pvu* II (*Proteus vulgaris*). O sítio de reconhecimento da maioria destas enzimas é uma sequência curta de 3 a 6 pb de comprimento, sendo a da *Pvu* II CAGCTG. Após a digestão do DNA com enzimas de restrição, são necessárias a separação e visualização dos produtos, que são feitos através de eletroforese em gel de agarose. Para que as sequências de inserção possam ser marcadas e visualizadas, é necessária a transferência do material para um filtro, ou membrana de nylon carregada positivamente. A transferência capilar é o método utilizado atualmente e se baseia no estabelecimento de um fluxo contínuo de NaOH através do gel de

agarose por capilaridade, carreando o material genético ali contido para o filtro de nylon colocado diretamente acima deste. O DNA clivado da micobactéria fica então retido na membrana de nylon, e para que se possam identificar as seqüências de inserção é necessária a preparação de sondas que contenham a seqüência genética complementar ao IS6110, que são obtidas pela técnica de PCR a partir de cepas de BCG, e que são hibridizadas através do anelamento da fita única da sonda obtida com o DNA desnaturado, presente na membrana. Para que se possa fazer a detecção destas sondas, e conseqüentemente das seqüências de inserção, é necessário que sejam marcadas previamente com material quimioluminescente, fornecido comercialmente. Para que haja a emissão de luz, banha-se a membrana com um agente de detecção, também disponível comercialmente. A análise das bandas correspondentes às seqüências de inserção IS6110 se faz então através da exposição de um filme de raio-x à membrana marcada, dessa forma evidenciando o número e a localização destas bandas no DNA bacteriano, caracterizando desta forma o polimorfismo entre as amostras estudadas .

O protocolo seguido neste estudo corresponde ao proposto por van Soolingen (VAN SOOLINGEN *et al*, 1994), porém modificado em alguns pontos para a adaptação às condições locais de realização. A análise dos padrões de RFLP foram realizados através do programa GelCompar II, versão 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Correlação entre as cepas foi calculada utilizando-se o coeficiente de similaridade de Dice com 2% de tolerância. O grau de similaridade considerado foi de 100%.

3.7.1. Digestão de DNA cromossômico pela *Pvu* II

Na digestão, o volume final da reação deve ser de 20µl obedecendo às proporções a seguir:

- X µl DNA (4,5 µg)
- 2 µl tampão (fornecido com a enzima)
- 1 µl *Pvu*II
- Y µl H₂O

Após adicionados à um microtubo de 200µl para PCR, encuba-se as amostras por 1 a 3 horas em banho maria, à 37°C. Adiciona-se 5µl azul de bromofenol 5x aos 20µl da reação, e coloca-se 5µl dos 25µl obtidos do DNA digerido em um pequeno gel, à 100V por aproximadamente 40 minutos para apreciar a digestão adequada do material e de sua concentração. Adiciona-se então o DNA remanescente a um gel de agarose a 0,9% de 20x 25cm para a realização do blot.

3.7.2. O gel para o Southern Blot

Em um gel de agarose a 0,9%, com 15 a 30 poços contendo amostras de DNA digerido, adiciona-se também duas a três amostras de marcadores padrão para *M. tuberculosis* digeridas também com *Pvu* II aos primeiro e último poços para comparação posterior. Realiza-se então a eletroforese por 10 minutos à 100V, para que as amostras deixem os poços uniformemente, e depois mantém-se a 25 ou 36V por aproximadamente 20 horas. Após eletroforese, cora-se o gel com brometo de etídio a 0,5µg/µl por 10 minutos e observa-se o padrão da corrida em transluminador UV, fotografando-se o gel para registro.

3.7.3. Hibridização e detecção do Southern Blot

Utiliza-se para este fim ECL direct nucleic acid labelling and detection systems RPN 3000, Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, England.

Após deixar o gel no transluminador UV por 5 minutos, para que o DNA seja quebrado em pedaços menores, põe-se o gel em uma bandeja contendo 0,25M HCl para depurinação do DNA, e mantém-se sob agitação por 10 minutos. Após depurinação, lava-se o gel brevemente com água destilada estéril, e adiciona-se 500ml NaOH 0,4M sob agitação por 20 minutos. Estes dois passos também quebram as moléculas de DNA em fragmentos menores, para melhor transferência para a membrana.

Monta-se então o gel em aparador de acrílico contendo NaOH 0,4M para transferência por capilaridade, deixando-o de 6 a 12 horas. Espera-se que na hora da retirada da membrana o gel esteja bastante fino.

Prosseguindo, pré-aquece-se o tampão de hibridização a 42°C (30ml). A membrana de nylon é umedecida com 5x SSC, enrolando-a cuidadosamente para colocação dentro do tubo de hibridização, com o lado contendo o DNA para o seu interior. Uma vez dentro do tubo, desenrola-se a membrana, garantindo-se que não fiquem bolhas entre a membrana e o tubo. Adiciona-se o tampão de hibridização pré-aquecido a 42°C deixando-o em pré-hibridização no forno a 42°C por 1 hora.

Marcar a sonda (produto do PCR de IS6110) usando o ECL direct nucleic acid labelling kit como indicado pelo fabricante (Amersham Life Sciences), numa concentração de 10ng por 10ml de tampão de hibridização. Após uma hora, adiciona-se a sonda marcada ao tampão e mantém-se a hibridização até o dia seguinte.

Após hibridização, descarta-se o tampão e adicionam-se 50 a 100ml de 5xSSC ao tubo, lavando a membrana por 5 minutos, a 42°C. Descartar o 5x SSC e adicionar tampão primário de lavagem (uréia 6M, SDS 0,4%, 0,1x SSC) até aproximadamente 1/3 do tubo, deixando em forno a 42°C por 20 minutos. Descarta-se então o tampão, substituindo-o pela mesma quantidade de tampão primário novo, repetindo o processo por 10 minutos. Retira-se então a membrana do tubo de hibridização, colocando-a em uma bandeja contendo 500ml de tampão secundário de lavagem (2x SSC), em agitação a temperatura ambiente por 5 minutos. Desprezar o tampão substituindo-o pela mesma quantidade de tampão secundário novo, repetindo o processo por mais 5 minutos.

Completo o processo de hibridização, passamos para detecção, misturando volumes iguais (10ml) de agente de detecção 1 e agente de detecção 2 (fornecido juntamente com o direct nucleic acid labelling and detection systems) que seja suficiente para cobrir a membrana, em uma pequena bandeja (recomenda-se 0,125ml /cm²). Usar a mistura da solução imediatamente, adicionando-a diretamente sobre a membrana e incubar em temperatura ambiente por 1 minuto. Drenar a membrana do excesso de reagente, colocando-a numa cobertura de plástico transparente, cortado no tamanho equivalente ao da membrana, dentro de um cassete para exposição ao filme. O lado da membrana contendo o DNA deve ficar voltado para cima. Numa sala escura, montar o filme no cassete, revelando-o em 5 a 10 minutos. Dependendo do resultado obtido, pode-se expor outro filme, avaliando se é necessário deixar mais ou menos tempo, para observação adequada das bandas.

3.8. Sequenciamento

A seleção das amostras de DNA para sequenciamento se deram a partir dos padrões eletroforéticos obtidos por SSCP, num total de quatro géis que continham 85 amostras resistentes mais 3 amostras sensíveis à isoniazida. Para a quantificação de DNA a ser usado na reação, é feito gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5µg/µl) e colocado nas duas extremidades 2µl de marcador de baixo peso molecular (Amersham, APB) mais 2µl de azul de bromofenol 5x e entre elas 2µl das amostras a serem estudadas mais 2µl de azul 5x em cada poço. Faz-se a corrida a 80V por aproximadamente 45 minutos. A estimativa da concentração de DNA se faz através de comparação da intensidade de luz emitida por cada amostra com aquela do marcador de baixo peso molecular.

Após quantificação, realizou-se a amplificação para seqüenciamento automático 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 cada iniciador (em reações separadas), 1,5 µl da solução *Terminator Ready Reaction Mix* do *BigDye* e água destilada estéril (volume final 10 µl). A reação, distribuída em placa específica para sequenciamento, foi protegida da luz com papel 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).

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 ml 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 as seguintes:

Voltagem – 1680 KV.

Corrente – 50,0 mA.

Potência – 150 Watts.

Temperatura do gel - 50°C.

Potência do laser – 40,0 mW.

Tempo de corrida – cerca de 3 horas.

As seqüências foram analisadas utilizando programa Chromas, versão 2.22 (Technelysium. Pty. Ltd.), e comparação dos nucleotídeos dos fragmentos obtidos foi realizada pela da Internet com a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al*, 1997).

RESULTADOS

4.1. Sensibilidade a outros quimioterápicos

Das 91 cepas INHr estudadas, 68 (74,7%) apresentavam também resistência à rifampicina, e 33 (36,3%) a mais que duas drogas. A resistência concomitante a isoniazida, rifampicina e pirazinamida ocorreu em 36,3% dos casos. A associação de resistência a isoniazida, rifampicina e etambutol foi encontrada em 9,9% dos casos. Outro dado interessante é que a resistência a qualquer outra droga, quando está presente a resistência a isoniazida, é bastante freqüente, sendo encontrada em 76,9% dos casos testados. Os resultados de testes de sensibilidade drogas são mostrados na tabela 1.

4.2. PCR/SSCP

O gene *katG* é composto por 2.220 bp e 740 códons. Utilizando o protocolo acima descrito, sintetizamos um par de iniciadores, proposto por Altamirano (ALTAMIRANO *et al*, 1994) para a amplificação de um fragmento de 237 pb correspondente à porção inicial do gene, entre os nucleotídeos 3 e 239. Realizamos o PCR do DNA proveniente de 91 cepas disponíveis até então, sendo que houve a amplificação de 87 fragmentos, todos com o peso molecular correspondente a 237 pb. Houve, entretanto, a amplificação de bandas inespecíficas de maior peso molecular, o que poderia comprometer a realização dos passos seguintes. Para aumentar a especificidade da reação, foi aumentada a temperatura de anelamento de 59°C para 62°C, e repetido o procedimento para as mesmas amostras, evidenciando-se então uma maior pureza nos fragmentos amplificados.

Iniciadores: *katg* 1 5'- GCC CGA GCA ACA CCC -3'
 katg 2 5'- ATG TCC CGC GTC AAG -3'

Após padronização adequada da reação de PCR, partimos para a realização do SSCP para as amostras amplificadas, um total de 24 cepas, sendo 21 resistentes e três sensíveis à isoniazida, em temperatura de 12°C e pH 8,3. Não houve boa definição das bandas com estes parâmetros, então seguimos com a padronização, realizando-as em diferentes pH e temperatura (5°C). O melhor resultado foi obtido com pH 9,0 e temperatura 5°C (figura 1).

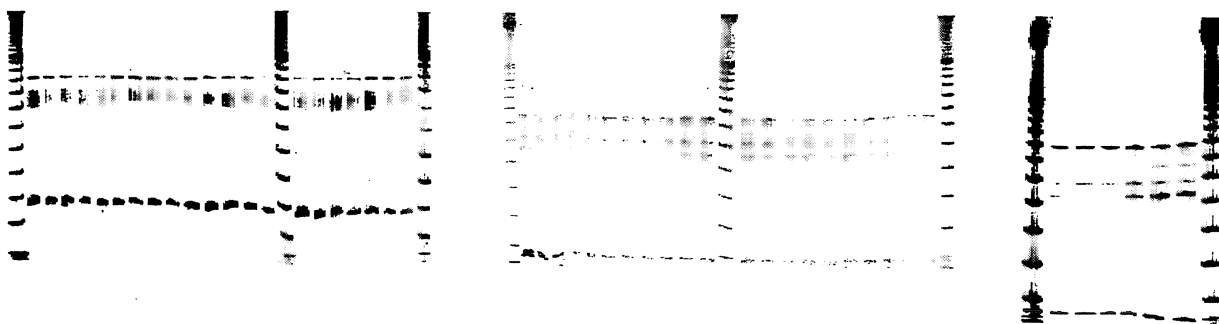


Figura 1 Fotos A, B, C, da esquerda para a direita, mostrando gel de poliacrilamida para realização de SSCP. Figura A realizado com pH 8,3 e temp. 12°C, figura B pH 8,3 e temp. 5°C, figura C pH 9,0 e temp 5°C. Note a melhor definição das bandas na figura C.

Realizados os SSCP para as 21 amostras de cepas resistentes, o que se observou foi um padrão de bandas igual ao das cepas sensíveis a isoniazida. Desta forma, não seria possível realizar a triagem para o posterior sequenciamento destas amostras, e uma hipótese seria a de que não houvesse mutações neste fragmento amplificado. Solicitamos então a síntese de mais três iniciadores que amplificassem uma área onde a frequência de mutações fosse maior, especificamente o códon 315. Ambos os fragmentos amplificados tiveram início no mesmo nucleotídeo (729), portanto usando o mesmo iniciador (Rouse5), porém utilizando iniciadores com término nos nucleotídeos 1254 e 1105 (HannaP6 e Rouse6, respectivamente).

Iniciador Rouse5 – Forward: 5' C GCG GCG GTC GAC ATT CG 3'.

Iniciador Rouse6 – Reverse: 5' GAA CGG GTC CGG GAT GGT G 3'.

Iniciador HannaP6 – Reverse: 5' CG GTG GAT CAG CTT GTA CCA G 3'.

C GCG GCG GTC GAC ATT CGC GAG ACG TTT CGG CGC ATG GCC ATG
AAC GAC GTC GAA ACA GCG GCG CTG ATC GTC GGC GGT CAC ACT TTC GGT
AAG ACC CAT GGC GCC GGC CCG GCC GAT CTG GTC GGC CCC GAA CCC
GAG GCT GCT CCG CTG GAG CAG ATG GGC TTG GGC TGG AAG AGC TCG TAT
GGC ACC GGA ACC GGT AAG GAC GCG ATC ACC **AGC** GGC ATC GAG GTC
GTA TGG ACG AAC ACC CCG ACG AAA TGG GAC AAC AGT TTC CTC GAG ATC
CTG TAC GGC TAC GAG TGG GAG CTG ACG AAG AGC CCT GCT GGC GCT TGG
CAA TAC ACC GCC AAG GAC GGC GCC GGT GCC GGC ACC ATC CCG GAC
CCG TTC GGC GGG CCA GGG CGC TCC CCG ACG ATG CTG GCC ACT GAC CTC
TCG CTG CGG GTG GAT CCG ATC TAT GAG CGG ATC ACG CGT CGC TGG CTG
GAA CAC CCC GAG GAA TTG GCC GAC GAG TTC GCC AAG GCC **TGG TAC**
AAG CTG ATC CAC CG

Bases = 525 (729-1254) - Códon 243-408

**C GCG GCG GTC GAC ATT CGC GAG ACG TTT CGG CGC ATG GCC ATG
AAC GAC GTC GAA ACA GCG GCG CTG ATC GTC GGC GGT CAC ACT TTC GGT
AAG ACC CAT GGC GCC GGC CCG GCC GAT CTG GTC GGC CCC GAA CCC
GAG GCT GCT CCG CTG GAG CAG ATG GGC TTG GGC TGG AAG AGC TCG TAT
GGC ACC GGA ACC GGT AAG GAC GCG ATC ACC **AGC** GGC ATC GAG GTC
GTA TGG ACG AAC ACC CCG ACG AAA TGG GAC AAC AGT TTC CTC GAG ATC
CTG TAC GGC TAC GAG TGG GAG CTG ACG AAG AGC CCT GCT GGC GCT TGG
CAA TAC ACC GCC AAG GAC GGC GCC GGT GCC GGC **ACC ATC CCG
GAC CCG TTC****

Bases = 376 (729 – 1105) - Códon 243-368

Realizamos então o PCR de todas as 97 amostras (duas eram provenientes do mesmo paciente) de micobactérias obtidas, com os dois pares de iniciadores descritos acima, e houve amplificação de todas as amostras, exceto a amostra 5, com Rouse5 e Rouse6 e de 88 amostras com Rouse5 e HannaP6. Na realização dos SSCP utilizamos os produtos de PCR dos iniciadores Rouse5 e Rouse6 cujo fragmento teria 376 pares de bases, mais adequado à realização do SSCP, por ser menor. Foram feitos 4 géis usando 84 amostras INHr, e pudemos então perceber mais de um padrão de bandas, diferentes das cepas sensíveis a isoniazida (4 amostras). A comparação entre os padrões só pode ser feita entre as amostras dentro de cada gel, e não entre os diferentes géis (figura 2). Assim, foi possível identificar 20 padrões diferentes de bandas, 10 representando padrões únicos (ocorrendo em apenas uma amostra). Os demais eram compostos por duas ou mais amostras, sendo estas agrupadas e, dentro de cada padrão, metade das amostras foi aleatoriamente selecionado para sequenciamento. Todas àquelas apresentado padrão único também foram incluídas, num total de 48 amostras resistentes e duas sensíveis a isoniazida (tabela 2).

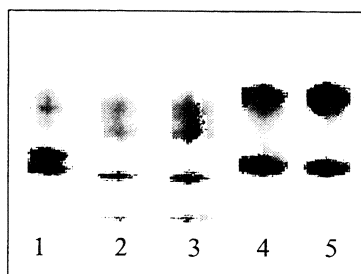


Figura 2: Padrões de SSCP de produtos de PCR dos genes *katG* de cepas de *M. tuberculosis*. Coluna 1 – INHr/sem mutação. Colunas 2 e 3 – INHr/mutação ACC. Coluna 4 – INHs/sem mutação ; e coluna 5 – INHr/sem mutação.

4.3. RFLP

Foram submetidas à genotipagem 85 cepas. Dessas, 83 eram resistentes e duas sensíveis à isoniazida. (figuras 3 e 4).

Dos padrões obtidos, utilizando o critério de 100% de similaridade, pudemos detectar a presença de 8 agrupamentos (“clusters”) todos com duas amostras cada. Existia evidência de vínculo epidemiológico óbvio em um desses agrupamentos já que foram obtidas de parentes em primeiro grau, provavelmente irmãos. Nos demais sete agrupamentos não havia relação epidemiológica geográfica que se pudesse estabelecer pelos registros.

Em quatro cepas que constituíam dois agrupamentos, foi feito o sequenciamento. Não houve correspondência entre o perfil genotípico obtido e a resistência à isoniazida. As cepas 78 e 103 apresentaram-se sem mutação e com a substituição AGC→ACC, e as cepas 13 e 63 apresentaram-se com as substituições AGC→ACC e AGC→AAC, respectivamente. Esses resultados validaram o prosseguimento do sequenciamento já que mostraram que as cepas em questão eram distintas genotipicamente.

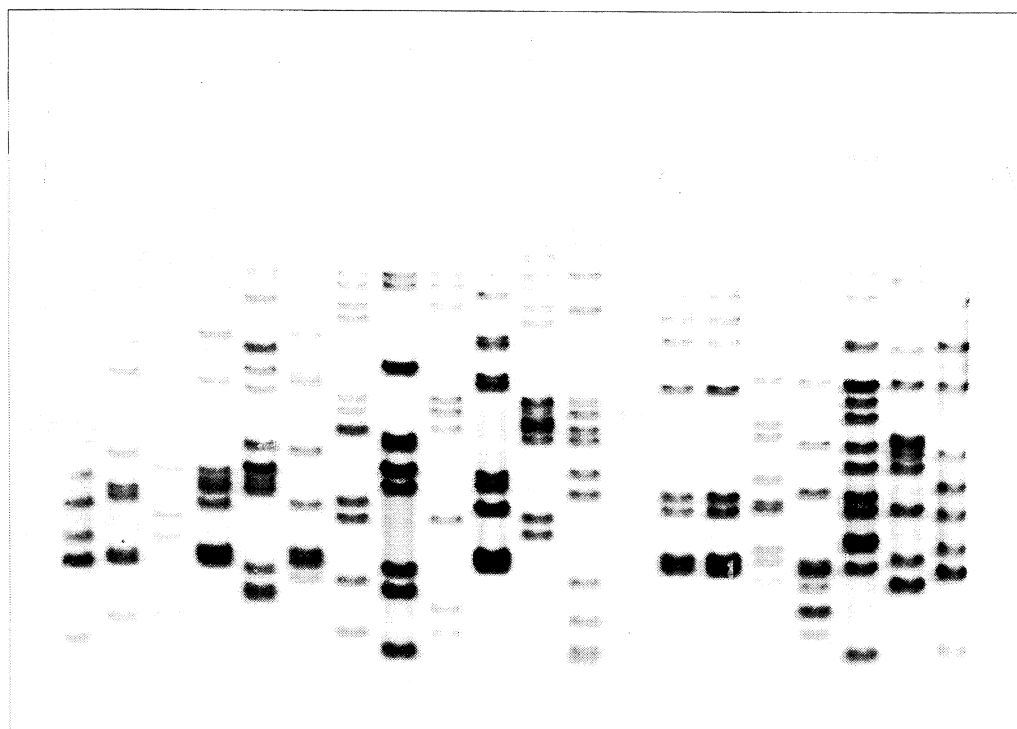


Figura 3: Exemplo de gel para Southern Blot / RFLP utilizado na genotipagem de micobactérias.

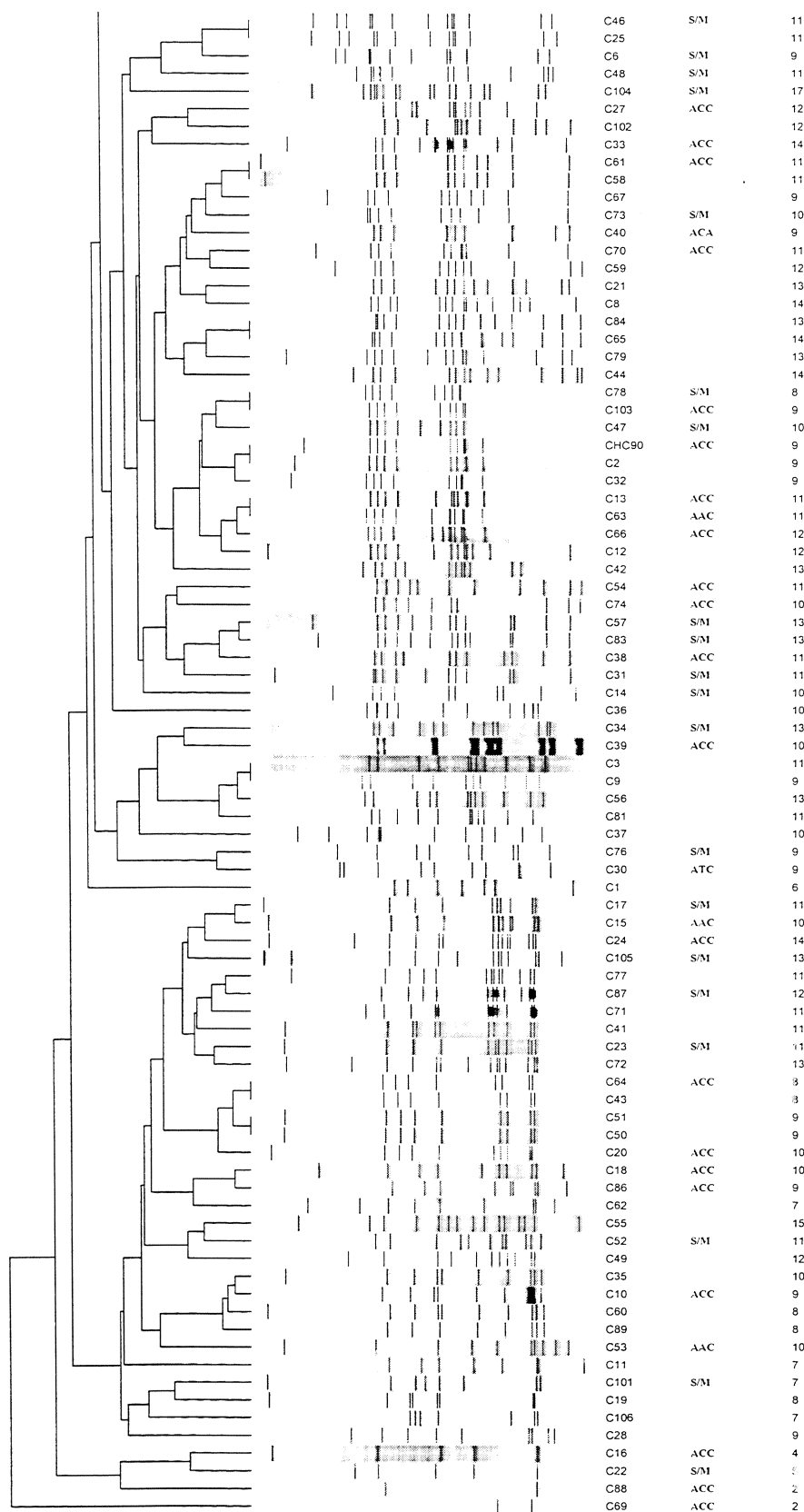


Figura 4: Dendrograma do RFLP de 85 cepas selecionadas. Colunas à direita da figura indicam número das cepas, mutações presentes (S/M=sem mutação) e número de bandas, respectivamente. Amostras 23 e 104 são INHs, demais INHr. Note padrão heterogêneo de bandas. Uma das amostras do agrupamento 58/61 foi excluída do estudo, por se tratar de espécimes provenientes do mesmo paciente.

4.4. Sequenciamento

As amostras selecionadas (48 INHr e 2 INHs) a partir dos padrões de SSCP foram seqüenciadas e obtivemos 6 variações de seqüências no códon 315 do gene *katG* (tabela 2). Um exemplo do cromatograma de sequenciamento é apresentado na figura 5.

Dentre as 48 amostras INHr, nenhuma mutação foi encontrada em 19 fragmentos amplificados (39,5%). A mutação mais freqüentemente encontrada foi AGC→ACC, levando a substituição do aminoácido Serina por Treonina em 23 dos casos (48%). Mais quatro mutações foram observadas em 6 casos (12,8%), sendo elas AGC→AAC (n=3), AGC→ACA (n=1), AGC→AGA (n=1) e AGC→ATC (n=1). As duas amostras INHs não apresentaram mutações no códon 315. Neste estudo, o SSCP triou corretamente para mutações (esteve em concordância com presença de mutações no sequenciamento), 81% dos casos analisados.

Os resultados obtidos mostraram que a relação entre a resistência das amostras a uma ou mais drogas e a presença de mutação, não apresentou significância estatística ($p>0,5$). Esses dados sugerem que as cepas multi-resistentes e não multi-resistentes apresentam-se com freqüências semelhantes de mutação no códon 315.

AGAGCTCGTATGGCACCGGAACCGGTAAAGGACGCGATCAACCAACGGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAAATG

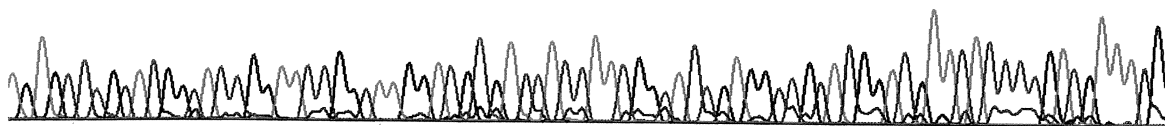


Figura 5: Cromatograma de sequenciamento da cepa 15. Observe a partir do nucleotídeo 174 o códon AAC, apresentando substituição A→C do códon original AGC.

Tabela 1. Sensibilidade aos antimicrobianos de 91 cepas de *M. tuberculosis* isoladas entre 1999-2000 em São Paulo.

Drogas	Número de cepas	
	N	%
I	21	23.1
I+R	35	38.5
I+R+P	21	23.1
I+R+E	2	2.2
I+R+P+E	6	6.6
I+R+P+E+S	1	1.1
I+R+P+S	2	2.2
I+R+ S	1	1.1
I+S	2	2.2
Total	91	100

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

Tabela 2. Distribuição das cepas de acordo com a mutação encontrada no códon 315 do gene *katG* e seus perfis de sensibilidade às drogas correspondentes.

Mutação	Resistência aos antimicrobianos						Total (%)
	I	I/R	I/R/ E	I/R/P	I/R/P/E	I/R/P/ E/S	
Ser→Thr (ACC)	5	7		7	3	1	23 (48%)
Ser→Asn (AAC)		1	1		1		3 (6.25%)
Ser→Thr (ACA)	1						1 (2.1%)
Ser→Arg (AGA)		1					1 (2.1%)
Ser→Ile (ATC)	1						1 (2.1%)
Sem mutação	3	11	1	4			19 (39.5%)
Total	10	20	2	11	4	1	48

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

DISCUSSÃO

5.1. Triagem das cepas

As cepas enviadas pelo IAL foram selecionadas aleatoriamente a partir dos espécimes clínicos recebidos de instituições de saúde do estado de São Paulo. Por não termos estabelecido, de início, um critério específico de seleção, distribuído de maneira uniforme ao longo do tempo, ou ainda de forma sequencial, fica prejudicada uma avaliação quanto à representatividade, portanto, a generalização de nossos achados. Há que se ressaltar também o fato de que o IAL é um centro de referência, para onde são encaminhadas amostras que, supostamente, apresentam uma probabilidade maior de resistência a drogas, criando um viés de seleção. Os critérios para envio de cepas para realização de teste de sensibilidade são: pacientes com co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana, casos de re-tratamento, casos de falência terapêutica ou quando se suspeite de resistência, isto é, pacientes institucionalizados e contatos de pacientes com TB resistente documentada. Esses critérios foram estabelecidos há muito tempo, porém só passaram a ser exigidos a partir do início de 2001, por causa da sobrecarga de trabalho no serviço, após o período de cobertura deste estudo. Não obstante esses dados acerca da frequência de resistência aos quimioterápicos não possam ser extrapolados para a população geral, eles prestam-se para a caracterização das mutações presentes nestas cepas, o que é o objetivo principal do estudo. Além disso, oferece um panorama da associação de resistência à isoniazida com as outras drogas utilizadas para o tratamento da tuberculose.

5.2. SSCP

A utilização da técnica de SSCP foi descrita pela primeira vez em 1989 (ORITA *et al.*, 1989) e seu emprego na triagem para mutações no DNA genômico de micobactérias se deu no início da década de 90 (ALTAMIRANO, *et al.* 1994; ROUSE & MORRIS, 1995; ROUSE *et al.*, 1995). A utilização desta técnica é especialmente útil em casos onde se pretende selecionar amostras para posterior caracterização das mutações a serem estudadas, devido à relativa simplicidade do método e sua fácil padronização, através de “kits” comerciais disponíveis. Neste caso utilizamos este método para selecionar cepas que apresentassem padrões eletroforéticos aberrantes quando em comparação com as cepas

padrão, ou sensíveis à INH. A concordância entre SSCP e sequenciamento, ou seja, a capacidade do SSCP diferenciar, dentro dos padrões obtidos, entre cepas com e sem mutações no códon 315, se deu em 81% dos casos. Há ainda a possibilidade de que haja maior concordância nesses casos, levando em consideração que avaliamos apenas mutações no códon 315, havendo ainda a possibilidade de que ocorram outras mutações em pontos diferentes do fragmento de *katG* amplificado, e que não foram avaliadas. O número de cepas INHs incluídas neste estudo não permite avaliações quanto à sensibilidade ou especificidade do método neste caso, mas foi útil e cumpriu seu papel proposto quanto à correta seleção da maior parte das cepas apresentando mutações. Apesar disso, esses dados sugerem que o SSCP não poderia ser empregado como método de seleção de cepas para realização de testes de sensibilidade para INH, já que um considerável número de espécimes clínicas com mutações em *katG* não seriam detectadas. Além disso, mutações em outros genes podem ser responsáveis pela resistência à INH (RAMASWAMY & MUSSER, 1998), sendo necessário a realização de testes subsequentes visando estes locais. O custo de tal abordagem seria proibitivo.

5.3. Abordagem molecular de tipagem de micobactérias

A análise genotípica de micobactérias vem sendo utilizada em diversas frentes no estudo da dinâmica de transmissão do *M. tuberculosis*. Em estudos epidemiológicos, vem sendo empregada com sucesso na detecção de surtos em serviços de saúde ou grupos específicos, assim como para avaliação do comportamento da disseminação da doença nas populações (SMALL *et al*, 1994; JEREB *et al*, 1993. IJAZ *et al*, 2002). Outra aplicação se dá na identificação e caracterização de contaminação de amostras em laboratórios de microbiologia (VAN DUIN *et al*, 1998; BRADEN *et al*, 1997).

No Brasil, estes estudos apresentam-se ainda em pequena escala. Algumas análises estão disponíveis, como aquela apresentada por Fandinho e colegas, investigando o padrão genotípico obtido em pacientes internados para tratamento para tuberculose (FANDINHO *et al*, 2000). Análise de clonalidade de cepas isoladas em pacientes acompanhados em hospital universitário foi realizado por Calusni e colaboradores (CALUSNI *et al*, 2003). Outros trabalhos utilizam a avaliação dos padrões de bandas dos elementos *IS6110* seja

para avaliação da transmissão em cenários urbanos (FERRAZOLI *et al*, 2000; BAPTISTA *et al*, 2002), ou para determinação de transmissão intra-hospitalar em pacientes infectados pelo HIV (RESENDE, 2002). Estudo de contaminação laboratorial resultando em um pseudo-surto foi analisado por Ramos e colaboradores (RAMOS *et al*, 1999) em laboratório de referência em uma universidade estadual.

No presente estudo, a realização de genotipagem pela identificação dos padrões de bandas das seqüências de inserção IS6110 teve o intuito de discriminar as cepas resistentes selecionadas, para que não fosse prejudicada a avaliação da freqüência das mutações encontradas, caso se tratassem de clones da mesma cepa. Na análise do dendrograma obtido pôde-se detectar 8 agrupamentos (“clusters”) de duas amostras cada, um terceiro era composto por isolados de parentes em primeiro grau. Neste último caso, os padrões de sensibilidade às drogas eram diferentes, sendo uma delas resistente à INH, RIF e PZA, e a segunda resistente, além dessas três drogas, também à estreptomicina. Estas amostras não foram sequenciadas. Apesar de não ser objeto do estudo, este achado aponta para o fato já levantado em outros trabalhos (BIFANI *et al*, 1996) de que, a tuberculose resistente, apresentando maior dificuldade no tratamento, principalmente quando não se conhece de antemão o perfil de sensibilidade das cepas, resulta em esquemas terapêuticos que na prática podem significar monoterapia, levando assim ao acúmulo de mais mutações quando transmitidas aos contatos. Aos outros sete agrupamentos não foi possível atribuir correlação de contato por falta de dados. Foram consideradas como cepas distintas já que os locais de isolamento das cepas de cada agrupamento eram diversos geograficamente e não se pode estabelecer parentesco pelos registros locais. Também o perfil de resistência aos quimioterápicos mostrou-se distinto em cinco entre os oito agrupamentos encontrados, sendo que as quatro cepas dos dois agrupamentos remanescentes eram resistentes apenas à isoniazida. Este achado está em acordo com o fato de que o perfil genotípico semelhante demonstrado por seqüências de inserção não implica em perfil de resistência semelhante, mesmo naquelas relacionadas epidemiologicamente, já que os sítios de mutações que levam à resistência são diversos. Quatro amostras de dois agrupamentos foram sequenciadas e, como apresentados em resultados, apresentavam mutações diferentes, ou não apresentavam mutações no códon 315. Dados acerca do tratamento instituído não foram levantados. Em conjunto, esses resultados sugerem que não estamos presenciando um surto de MDR-TB,

mas antes desenvolvimento de resistência individual, talvez por irregularidades no tratamento ou abandono. Para que tal fato seja comprovado, seria necessário aprofundamento do estudo com coleta de dados de forma sistemática.

Como exposto anteriormente, o controle da tuberculose passou a ser de interesse mundial devido a sua alta incidência e pelo risco potencial de disseminação de cepas resistentes, o que torna o seu tratamento mais custoso clínica e financeiramente. A resistência à isoniazida, uma das drogas de primeira escolha para o tratamento da tuberculose, está relacionada e associada a vários mecanismos, com mutações dentro do próprio *katG*, como também em outros genes como *inhA*, *kasA*, *ndh* e a região *intergênia oxyR-ahpC*. Além disso, alguns trabalhos mostram que a isoniazida induz a expressão de diversos genes em *M. tuberculosis* que codificam proteínas que são relevantes ao modo de ação da droga (RAMASWAMY *et al*, 2003). A necessidade de minimizar a transmissão de cepas resistentes às drogas requer procedimentos que possibilitem a sua rápida identificação. O conhecimento dos mecanismos de resistência preponderantes em determinado local ou região é essencial para que se possa desenvolver e aplicar técnicas novas e mais rápidas de análise genotípica, que venham a contribuir para a diminuição da sua disseminação.

A análise da incidência e prevalência de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos antituberculosíacos tem sido realizado de modo desigual no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Países com sistemas de vigilância mais bem estruturados apresentam dados mais confiáveis e completos, enquanto que em muitos países em desenvolvimento, especialmente aqueles onde a incidência de tuberculose é maior, não dispõem de tais informações. Foi possível avaliar, através do projeto global de vigilância da resistência às drogas antituberculosas, iniciado pela OMS e pela IUATLD (PABLOSMÉNDEZ *et al*, 1998), que este era um fenômeno mundial, sendo registrada em praticamente todas as regiões ou países dos cinco continentes que entraram no projeto. Neste estudo, resistência a pelo menos uma droga ocorreu numa frequência entre 2 e 41% sem tratamento prévio relatado para TB, numa mediana de 9,9%, sendo que para INH a mediana foi de 7,3%. O fenômeno da multiresistência (resistência à INH e RIF - MDR) ocorreu numa frequência consideravelmente menor, variando entre 0 e 14,4%, numa mediana de 1,4%. Quando havia o relato prévio de tratamento esses valores também

aumentaram consideravelmente, sendo a sua prevalência de 36% (entre 5,3 e 100%) para uma droga e 13% (entre 0 e 54%) para multiresistência. As regiões mais afetadas foram o leste europeu e regiões da Ásia, como a Índia. Este projeto apontou para o fato de uma necessidade urgente de implementação de medidas mais eficazes de controle nestas regiões, para evitar a disseminação de cepas resistentes. A continuidade do projeto resultou na expansão das áreas estudadas, incluindo algumas onde a incidência e prevalência de tuberculose é alta (ESPINAL *et al*, 2001.). Nas áreas de baixa incidência os níveis de resistência permaneceram estáveis, porém aumentaram significativamente em outros locais como Estônia (leste europeu), Rússia e Dinamarca. Quedas expressivas foram relatadas nos EUA e Espanha. Essa iniciativa reforça a importância de se obter informações confiáveis e representativas da situação da tuberculose nas diversas regiões para que se possa estruturar ações para seu combate.

O Brasil participou da primeira fase do projeto (1994-1997), em que enviou resultados de suscetibilidade de 2888 cepas provenientes tanto de pacientes em início de tratamento (2.095) como com tratamento prévio (793) (PABLOS-MÉNDEZ *et al*, 1998). O que se observou foi a presença de mono-resistência primária à INH em 3,8 % dos casos e resistência associada à qualquer outra droga em 5,9 % dos casos. A porcentagem de pacientes com tuberculose resistente pelo menos à INH e PZA, sem história de tratamento prévio foi de 0,9%. Infelizmente não foi dada continuidade à coleta destes dados, e, portanto, não temos dados mais recentes para comparação. Como aconteceu em outras regiões do mundo, com o aumento da cobertura do regime de DOTs, espera-se que no Brasil esta incidência possa ter caído. Neste estudo, e mais especificamente no Brasil, não foi realizada a genotipagem das amostras para que se pudesse observar qual seria o padrão de distribuição e disseminação destas cepas. Retomada desta coleta de dados e análises populacionais com utilização dos métodos de genotipagem são necessárias para uma avaliação temporal fidedigna e para estruturação de estratégias para o controle da tuberculose resistente.

A resistência à INH no estado de São Paulo foi encontrada em 6,3% dos casos (COHN *et al*, 1997) e é a segunda em frequência, atrás apenas da estreptomicina. O número de cepas testadas no presente estudo representa aproximadamente 10% do total esperado de cepas INHr no mesmo período no estado de São Paulo (DYE *et al*, 2002), segundo estudos

prévios. Resistência concomitante a RIF também foi detectada em número expressivo de cepas (74,8%). Essa alta taxa de resistência a RIF, assim como às outras drogas, não pode ser extrapolada para a população geral. Como descrito acima, essas cepas são enviadas para teste de sensibilidade obedecendo a critérios que selecionam cepas onde a resistência é esperada. Assim sendo tais dados podem apenas ser correlacionados à populações com características semelhantes às das acima descritas (re-tratamento, co-infecção TB-HIV, etc). Dessa forma podemos inferir que, nessas populações, muito embora a coleta de dados não tenha sido realizada de forma a avaliar valor preditivo, há grande probabilidade deste microorganismo apresentar também resistência a RIF e a PZA (tabela 1), quando a resistência à INH esta presente. Por outro lado a resistência combinada destas três drogas mais ETB foi infrequente, sugerindo que esta combinação ainda é uma boa indicação, principalmente em casos onde é esperada uma frequência maior de resistência, como em pacientes institucionalizados e pacientes imunossuprimidos pelo vírus da imunodeficiência humana (PINTO *et al*, 2001).

A presença de mutação no códon 315 do gene *katG* foi encontrado em 60,5% das amostras testadas, com predominância do alelo ACC (79,3%), em substituição ao AGC (tabela 2). A prevalência desta substituição entre as cepas INHr vem sendo reportado em frequências variáveis, entre 35 e 91%, dependendo da região estudada (AHMAD *et al*, 2002; MOKROUSOV *et al*, 2002). De acordo com esses estudos, o alelo ACC é mais encontrado dentre as cepas multiresistentes. Na Holanda (VAN SOOLINGEN *et al*, 2000) das cepas que apresentaram esta mutação, apenas 33% eram mono-resistentes à INH, em comparação com 69% daquelas onde mutações no códon 315 não estavam presentes. Neste estudo, a genotipagem indicou menor índice de agrupamentos entre as cepas sensíveis à isoniazida em comparação com as resistentes. Piatek e colegas (PIATEK *et al*, 2000) também apresentaram achados semelhantes, onde apenas 44% das cepas com mono-resistência à INH provenientes de centro de saúde comunitário apresentaram tal mutação. É sugerido neste trabalho que a mutação no códon 315 é superestimada quando os isolados são provenientes de um laboratório de referência, quando comparados a centros de tratamento comunitários. Em nosso contexto, onde a prevalência de TB é alta, 70% das cepas multiresistentes e 57,9% das cepas mono-resistentes à INH apresentaram mutações no códon 315 ($p>0,5$). A diferença não foi estatisticamente significativa, uma das possíveis

explicações encontra-se no texto mais abaixo. Na Rússia, (MOKROUSOV *et al*, 2002) onde as cepas multiresistentes são predominantes, a mutação no codon 315 foi encontrada em 91% das cepas, em grande parte devido a disseminação clonal, já que a maioria delas pertencem a família Beijing, cuja frequência é alta na Ásia e sua disseminação parece ser mais eficaz que das outras cepas (ESPINAL, 2003). Resultados semelhantes foram achados na Latvia (TRACEVSKA *et al*, 2002), embora genotipagem não tenha sido realizada para avaliar a clonalidade das amostras.

Dois trabalhos recentemente publicados no Brasil apresentam resultados semelhantes aos aqui encontrados. Silva e colaboradores (SILVA *et al*, 2003), com amostras provenientes de três estados brasileiros (RS, RJ e SP), encontraram frequências variáveis de mutações no códon 315 de *katG*, sendo que a menor delas foi em São Paulo, com 60% dos casos. Os MICs eram maiores que 16 µg/µl na maioria dos casos. Entretanto, o número de amostras foi reduzido (n=15). Nessas amostras, 6,7% apresentavam mutações em *ahpC*. Através de genotipagem por RFLP IS6110 não foi encontrada disseminação clonal de cepas. Cardoso *et al* (2004) estudaram amostras de São Paulo e Paraná. Nestes estados encontraram mutações no códon 315 de *katG* em 61,9% dos casos, e outras mutações em outros loci de *katG* em mais 23,7% dos casos. Estudo de SSCP esteve em concordância com sequenciamento em 90,7% dos casos, levando em consideração que avaliaram outras regiões de *katG* assim como *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC*.

Das cepas seqüenciadas neste estudo, uma porcentagem elevada (39,5%) não apresentou mutações em *katG*315. Além disso, a diferença estatística não foi significativa com relação à presença de mutações em cepas mono ou multi-resistentes. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que as amostras foram testadas quanto à resistência a INH até uma concentração de 0,2 µg/ml, podendo estar incluídas muitas amostras com baixo nível de resistência. As mutações neste códon estão relacionadas à altas taxas de resistência. Em trabalho realizado por van Soolingen (VAN SOOLINGEN *et al*, 2000), 89% das cepas que apresentaram mutações neste códon (53% do total avaliado) tinham MIC entre 5 e 10 µg/ml. Das cepas que não apresentaram mutações (47%), o MIC para INH estava entre 0,5 e 1 µg/ml em 75% dos casos.

Os isolados deste trabalho apresentaram padrões de RFLP bastante heterogêneos, compatíveis com disseminação não clonal de cepas INHr. Da mesma forma, dois dos

agrupamentos revelados pela genotipagem não apresentaram correlação entre padrões de RFLP e resistência às drogas.

O desenvolvimento de técnicas moleculares mais rápidas para detecção de mutações no códon 315 do gene *katG* permitiriam a detecção precoce de resistência à INH em cepas de *M. tuberculosis*. Esse fato facilitaria o ajuste da terapêutica empregada, reduzindo as chances de desenvolvimento de mutações adicionais, prevenindo também a transmissão destas cepas na comunidade. Apesar disso, dada a grande diversidade de mutações presentes, assim como sua localização, tanto dentro do gene *katG* como em outros genes, tal abordagem não seria capaz de detectar grande proporção das cepas resistentes. O presente estudo confirma a alta frequência de amostras resistentes à INH que não apresentam mutações no códon 315, e seria necessária avaliação de outras regiões de *katG*, assim como de outros genes, como demonstrado em outros trabalhos brasileiros (SILVA *et al*, 2003, CARDOSO *et al*, 2004).

CONCLUSÃO

- A análise genotípica das micobactérias resistentes à isoniazida mostrou baixo grau de similaridade entre as cepas, estando presentes sete agrupamentos com apenas duas amostras cada. Apenas em uma amostra foi possível estabelecer correlação epidemiológica, se tratando de parentes em primeiro grau.
- Por esta análise sugere-se que não estamos presenciando uma epidemia de tuberculose resistente, mas antes o surgimento isolado de resistência, provavelmente secundário ao uso inadequado das medicações ou abandono.
- Nas cepas INHr estudadas foi elevada a frequência de resistência concomitante para RIF (74,7%) e RIF e PZA (33%), sugerindo que, quando encontrada resistência à INH, é elevado o risco de que também esteja presente resistência a outras drogas de primeira linha, em populações de alto risco, como o caso das incluídas neste trabalho.
- A mutação mais freqüente no códon 315 do gene *katG* foi a substituição AGC→ ACC, encontrada em 48% dos casos. Outros quatro padrões de mutação foram caracterizados e uma porcentagem elevada de cepas INHr não apresentaram mutações (39,5%).
- Os padrões de mutações relacionadas ao códon 315 encontradas nas cepas isoladas neste estudo acompanham o padrão mundial descrito até o momento.
- Estudos mais abrangentes de biologia molecular e epidemiologia devem ser elaborados para uma melhor compreensão da dinâmica de disseminação da tuberculose, inclusive daquelas resistentes às drogas, para que se estabeleçam ações para seu controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, G.; HOFFNER, S.E.; ØSTERGAARD, T.V.; MIÖRNER, H. Characterization of isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in *katG*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 20: 329-333, 2001.

AHMAD, S.; HOFFNER, S.E.; ØSTERGAARD, T.V.; MIÖRNER, H. Prevalence of S315T mutation within the *katG* gene in isoniazid-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Dubai and Beirut. **Int J Tuberc Lung Dis**, 6(10): 920-926, 2002.

ALTAMIRANO, M.; MAROSTENMAKI, J.; WONG, A.; FITZGERALD, M.; BLACK, W.A.; SMITH, J.A. Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **J Infect Dis**, 169: 1162-1165, 1994.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, 25: 3389-3402, 1997.

AMERICAN THORACIC SOCIETY - CENTERS FOR DISEASE CONTROL - Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis. **Am J Respir Dis**, 142: 725-35, 1990.

BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; UM, K.S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; DE LISLE, G.; JACOBS, W.R. *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, 263: 227-230, 1994.

BAPTISTA, I.M.F.D; OELEMAN, M.C.; OPROMOLLA D.V.A.; SUFFYS, P.N. Drug resistance and genotypes of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency virus infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 97(8): 1147-1152, 2002.

BASSO, L.A.; ZHENG, R; MUSSER, J.M.; JACOBS JR, W.R.; BLANCHARD, J.S. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. **J Infect Dis**, 178(3): 769-775, 1998.

BASSO, L.A.; ZHENG, R.; BLANCHARD, J.S. Kinetics of inactivation of WT and C243S mutant of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase by activated isoniazid. **J Am Chem Soc**, 118: 11301-11302, 1996.

- BIFANI, P.J.; PLIKAYTIS, B.B.; KAPUR, V.; STOCKBAUER, K.; PAN, X.; LUTFEY, M.L.; MOGHAZEH, S.L.; EISNER, W.; DANIEL, T.M.; KAPLAN, M.H.; CRAWFORD, J.T.; MUSSER, J.M.; KREISWIRTH, B.N. Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. **JAMA**, 275(6): 452-457, 1996.
- BRADEN, C.R.; TEMPLETON, G.L.; STEAD, W.W.; BATES, J.H.; CAVE, D.; VALWAY, S.E. Retrospective detection of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures with use of DNA fingerprint analysis. **Clin Infect Dis**, 24: 35-40, 1997.
- CALUSNI, A.L.; ROSCANI, G.N.; VILLARES, M.C.; SOINI, H.; GRAVISS, E.A.; RAMOS, M. DE 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): 655-658, 2003.
- CARDOSO R.F.; COOKSEY R.C.; MORLOCK G.P.; BARCO P.; CECON L.; FORESTIERO F.; ET AL. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, 48: 3373-81, 2004.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. 2002. Reports on chronic diseases: tuberculosis. [Online]. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/Cve_tb.htm.
- COCKERILL III, F.R.; UHL, J.R.; TEMSGEN, 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 (*katG*) gene associated with isoniazid resistance. **J Infect Dis**, 171: 240-245, 1995.
- COHN, D.; BUSTREO, F.; RAVIGLIONE, M.C. Drug-resistant tuberculosis: review of the world-wide situation and the WHO/IAUTLD global surveillance project. **Clin Infect Dis**, 24 (Suppl 1): S121-130, 1997.
- COHN, M.L.; KOVITZ, C.; ODA, U.; MIDDLEBROOK, G. Studies on isoniazid and tubercle bacilli. II. The growth requirements, catalase activities, and pathogenic properties of isoniazid-resistant mutants. **Am Rev Tuberc**, 70: 641-664, 1954.

COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, 393 (6685): 537-544, 1998.

COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. **Tuberculosis bacteriology: organization and practice**. 2nd ed. Butherworth-Heinemann, London, England, 1997.

DELIDOW, B.C.; LYNCH, J.P.; PELUSO, J.P.; WHITE, B. Polymerase Chain Reaction. In: (Harwood A J, Ed.), **Methods in Molecular Biology, Vol 58: Basic DNA and RNA protocols** pp 275-292. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1996.

DERETIC, V.; PHILLIP, W.; DHANDAYUTHAPANI, S; MUDD, M.H.; CURCIC, R.; GARBE, T.; HEYM, B.; VIA, L.E.; COLE, S.T. *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid. **Mol microbiol**, 17: 889-900, 1995.

DOBNER, P.; RÜSCH-GERDES, S.; BRETZEL, G.; FELDMANN, K.; RIFAI, M.; LOSCHER, T.; RINDER, H. Usefulness of *Mycobacterium tuberculosis* genomic mutations in the genes *katG* and *inhA* for the prediction of isoniazid resistance. **Int J Tuberc Lung Dis**, 1: 365-369, 1997.

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.

ESCALANTE, P.; RAMASWAMY, S.; SANABRIA, H.; SOINI, H.; PAN, X.; VALIENTE-CASTILLO, O.; MUSSER, J.M. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. **Tuberc Lung Dis**, 79: 111-118, 1998.

ESPINAL, M.A. The global situation of MDR-TB. **Tuberculosis**, 83: 44-51, 2003.

ESPINAL, M.A., LASZLO, A., SIMONSEN, L.; BOULAHBAL, F.; KIM, S.J.; RENIERO, A.; HOFFNER, S.; RIEDER, H.L.; BINKIN, N.; DYE, C.; PHIL, D.; WILLIAMS, R.; RAVIGLIONE, M.C. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. **N Engl J Med**, 344 (17): 1294-1303, 2001.

FANDINHO, F.C.; KRITSKI, A.L.; HOFER, C.; JUNIOR CONDE, H.; FERREIRA, R.M.; SAAD, M.H.; SILVA, M.G.; RILEY, L.W.; FONSECA, L.S. RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 94(3):271-5, 2000.

FARR, S.B.; KOGOMA, T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiol Rev**, 55: 561-585, 1991.

FERRAZOLI, L.; PALACI, M.; MARQUES, L.R.; JAMAL, L.F.; AFIUNE, J.B.; CHIMARA, E.; MARTINS, M.C.; SILVA TELLES, M.A.; OLIVEIRA, C.A.; PALHARES, M.C.; SPADA, D.T.; RILEY, L.W. Transmission of Tuberculosis in an Endemic Urban Setting in Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis**, 4(1):18-25, 2000.

GOTO, M.; OKA, S.; TASHIKAWA, N.; KITADA, K.; WADA, M.; ABE, C.; SHIMADA, K.; KIMURA, S. *KatG* sequence deletion is not the major cause of isoniazid resistance in Japanese and Yemeni *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Mol Cell Probes**, 9: 433-439, 1995.

HAAS, W.A.; SCHILKE, K.; BRAND, J.; AMTHOR, B.; WEYER, K.; FOURIE, P.B.; BRETZEL, G.; STICHT-GROH, V.; BREMER, H.J. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. **Antimicrob Agents Chemother**, 41: 1601-1603, 1997.

HEDGECOCK, L.W.; FAUCHER, I.O. Relation of pirogalol-peroxidative activity to isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Am Rev Tuberc**, 75: 670-674, 1957.

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: 235-245, 1995.

HEYM, B.; ZHANG, Y.; POULET, S.; YANG, D.; COLE, S.T. Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Bacteriol**, 175: 4255-4259, 1993.

HONGYO, T.; BUZARD, G.S.; CAIVERT, R.J. Cold SSCP: a single, rapid, non radioactive method for optimized single strand conformation polymorphism analysis. **Nucleic Acid Res**, 21(16) 3637-3642, 1993.

IJAZ, K.; YANG, Z.; MATTHEWS, S.; BATES, J.H.; CAVE, M.D. *Mycobacterium tuberculosis* transmission between cluster members with similar fingerprint patterns. **Emerg Infect Dis**, 8: 1257-1259, 2002.

- JEREB, J.A.; BERWIN, D.R.; DOOLEY, S.W.; HAAS, W.H. Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit: application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **J Infect Dis**, 168: 1219-1224, 1993.
- JOHNSSON, K.; FROLAND, W.A.; SCHULTZ, P.G. Overexpression, purification, and characterization of the catalase-peroxidase *katG* from *Mycobacterium tuberculosis*. **J Biol Chem**, 272: 2834-2840, 1997.
- JOHNSSON, K.; KING, D.S.; SCHULTZ, P.G. Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis. **J Am Chem Soc**, 117: 5009-5010, 1995.
- JOHNSSON, K.; SCHULTZ, P.G. Mechanistic studies of the oxidization of isoniazid by the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. **J Am Chem Soc**, 116: 7425-7426, 1994.
- KOCHI, A.; VARELDZIS, B.; STYBLO, K. Multi-drug resistant tuberculosis and its control. **Res Microbiol**, 144: 104-110, 1993.
- LEE, A.S.G.; LIM, I.H.K.; TANG, L.L.H.; TELENTI, A.; WONG, S.Y. Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. **Antimicrob. Agents Chemother**, 43:2087-2089, 1999.
- LEE, A.S.G.; TANG, L.L.H.; LIM, I.H.K.; LING, M.L.; TAY, L.; WONG, S.Y. Lack of clinical significance for the common arginine-to-leucine substitution at codon 463 of the *katG* gene in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. **J Infect Dis**, 176: 1125-1126, 1997.
- LOEWEN, P.C.; SWITALA, J.; SMOLENSKI, M.; TRIGGS-RAINE, B.L. Molecular characterization of three mutations in *katG* affecting the activity of hydroperoxidase I of *Escherichia coli*. **Biochem Cell Biol**, 68: 1037-1044, 1990.
- MARTTILA, H. J.; SOINI, H.; EEROLA, E.; VYSHNEVSKAYA, E.; VYSHNEVSKIY, B.I.; OTTEN, T.F.; VASILYEF, A.V.; VILJANEN, M.K. A Ser315Thr substitution in *katG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. **Antimicrob. Agents Chemother**, 42: 2443-2445, 1998.

MARTTILA, H.J.; SOINI, H.; HUOVINEN, P.; VILJANEN, M.K. *KatG* mutations in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Finnish patients. **Antimicrob Agents Chemother**, 40: 2187-2189, 1996.

MCADAM, R.A.; QUAN, S.; GUILHOT, C. Mycobacterial Transposons and Their Applications. In: (G. F. Hatfull, W.R. Jacobs Jr, Eds), **Molecular Genetics of Mycobacteria**, pp 69-84, 2000.

MDLULI, K.; SHERMAN, D.R.; HICKEY, M.J.; KREISWIRTH, B.N.; MORRIS, S.; STOVER, C.K.; BARRY III, C.E. Biochemical and genetic data suggest that *inhA* is not the primary target for activated isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Infect Dis**, 174: 1085-1090, 1996.

MDLULI, K.; SLAYDEN, R.A.; ZHU, Y.; RAMASWAMY, S.; PAN, X.; MEAD, D.; CRANE, D.D.; MUSSER J.M.; BARRY III, C.E. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. **Science**, 280: 1697-1610, 1998.

MIDDLEBROOK, G. Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli. A preliminary report. **Am Rev Tuberc**, 69: 471-472, 1954.

MIDDLEBROOK, G.; COHN, M.L.; SCHAEFER, W.B. Studies on isoniazid and tubercle bacilli. III. The isolation, drug-susceptibility and catalase-testing of tubercle bacilli from isoniazid-treated patients. **Am Rev Tuberc**, 70: 852-872, 1954.

MOKROUSOV, I.; NARVSKAYA, O.; OTTEN, T.; LIMESCHENKO, E.; STEKLOVA, L.; VYSHNEVSKIY, B. High prevalence of *katG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia, 1996 to 2001. **Antimicrob Agents Chemother**, 46: 1417-1424, 2002.

MORRIS, S.L.; NAIR, J.; ROUSE, D. J. The catalase-peroxidase of *Mycobacterium intacellulare*: nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli*. **J Gen Microbiol**, 138: 2363-2370, 1992.

MUSSER, J. M.; KAPUR, V.; WILLIAMS, D.L.; KREISWIRTH, B.N.; VAN SOOLINGEN, D.; VAN EMBDEN, J.D.A. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and –suceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. **J Infect Dis**, 173: 196-202, 1996.

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

ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, 5 (4): 874-879, 1989.

PABLOS-MÉNDEZ, A.; RAVIGLIONE, M.C.; LASZLO, A.; BINKIN, N.; RIEDER, H.L.; BUSTREO, F.; COHN, D.L.; CATHERINA, S.B.; VAN WEEZENBEEK, L.; KIM, S.J.; CHAULET, P.; NUNN, P. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. **N Engl J Med**, 338 (23): 1641-1649, 1998.

PELLETIER, H.; KRAUT, J. Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome c peroxidase and cytochrome c. **Science**, 258:1748-1755, 1992.

PIATEK, A. S.; TELENTI, A.; MURRAY, M.R.; EL-HAJJ JR., H.; JACOBS, W.R.; KRAMER, F.R.; ALLAND, D. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. **Antimicrob Agents Chemother**, 44: 103-110, 2000.

PINTO, W.P.; HADAD, D.J.; SILVA TELLES, M.A.; UEKI, S.Y.; PALACI, M.; BASILE, M.A. Tuberculosis and drug resistance among patients seen at an AIDS reference center in São Paulo, Brazil. **Int J Infect Dis**, 5 (2): 93-100, 2001.

PRETORIUS, G.S.; VAN HELDEN, P.D.; SIRGEL, F.; EISENACH, K.D.; VICTOR, T.C. Mutations in *katG* gene sequence in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* are rare. **Antimicrob Agents Chemother**, 39 : 2276-2281, 1995.

QUÉMARD, A.; DESSEN, A.; SUGANTINO, M.; JACOBS, W.R. JR.; SACCHETTINI, J.C.; BLANCHARD, J.S. Binding of catalase-peroxidase-activated isoniazid to wild-type mutant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductases. **J Am Chem Soc**, 118: 1561-1562, 1996.

RAMASWAMY, S.; MUSSER, J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 Update. **Tuber Lung Dis**, 79: 3-29, 1998.

RAMASWAMY, S.V.; REICH, R.; DOU, S.J.; JASPERSE, L.; PAN, X.; WANGER, A.; QUITUGUA, T.; GRAVISS, E.A. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, 47(4):1241-1250, 2003.

RAMOS, M.C.; SOINI, H.; ROSCANI, G.C.; JAQUES, M.; VILLARES, M.C.; MUSSER, J.M. Extensive cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. **J Clin Microbiol**, 37: 916-919, 1999.

RESENDE, M.R. **Epidemiologia molecular da tuberculose entre pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana atendidos em um hospital universitário brasileiro**, 2002. [Tese - doutorado – Universidade Estadual de Campinas]

RORSWARSKI, D.A.; GRANT, G.A.; BARTON, D.H.R.; JACOBS JR, W.R.; SACCHETTINI, J.C. Isoniazid modifies the NADH of its target enzyme (*inhA*) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, 279: 98-101, 1998.

ROSNER, J.L. Susceptibilities of *oxyR* regulon mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to isoniazid. **Antimicrob Agents Chemother**, 37: 2251-2253, 1993.

ROUSE, D. A.; DE VITO, J.A.; LI, Z.; BYER, H.; MORRIS, S.L. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. **Mol Microbiol**, 22: 583-592, 1996.

ROUSE, D.A.; MORRIS, S.L. Molecular mechanisms of resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. **Infect Immun**, 63: 1427-1433, 1995.

ROUSE, D.A.; LI, Z.; BAI, G.H.; MORRIS, S.L. Characterization of the *katG* and *inhA* genes of isoniazid resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, 39: 2472-2477, 1995.

SHEFFIELD, C.V.; BECK, J.S.; KWITCK, A.E.; SANDSTROM, D.W.; STONE, E.M. The sensitivity of single strand polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. **Genomics**, 16 (2): 325-332, 1993.

SILVA M.S.N.; SENNA S.G.; RIBEIRO M.O.; VALIM A.R.M.; TELLES M.A.; KRITSKI A.; et al. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, 41: 4471-74, 2003.

SMALL, P.M.; HOPEWELL, P.C.; SINGH, S.P.; PAZ, A.; PARSONNET, J.; RUSTON, D.C.; et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. **N Engl J Med**, 330: 1703-1709, 1994.

SMITH, D.R. Restriction Endonuclease Digestion of DNA. In: (Harwood A J, Ed.) **Methods in Molecular Biology, Vol 58: Basic DNA and RNA protocols**, pp 11-15. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1996.

STOECKLE, M.Y.; GUAN, L.; RIEGLER, N.; WEITZMAN, I.; KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J.; LARAQUE, F.; RILEY, L.W. Catalase-peroxidase gene sequences in isoniazid-sensitive and -resistant strains *Mycobacterium tuberculosis* from New York City. **J Infect Dis**, 168: 1063-1065, 1993.

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

TRACEVSKA, T.; JANSONE, I.; BROKA, L.; MARGA, O.; BAUMANIS, V. Mutations in the *rpoB* and *katG* genes leading to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. **J Clin Microbiol**, 40: 3789-3792, 2002.

VAN DOORN, H. R.; KUIJPER, E.J.; VAN DER ENDE, A.; WELTEN, A.G.A.; VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P.E.W.; DANKERT, J. The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg→Leu Mutation at codon 463 of *katG* are not associated. **J Clin Microbiol**, 39: 1591-1594, 2001.

VAN DUIN, J.M.; PIJNEMBURG, J.E.M.; VAN RIJSWOUD, C.M.; DE HAAS, P.E.W.; HENDRIKS, W.D.H.; VAN SOOLINGEN, D. Investigation of cross contamination in a *Mycobacterium tuberculosis* laboratory using IS6110 DNA fingerprinting. **Int J Tuberc Lung Dis**, 2: 425-429, 1998.

VAN SOOLINGEN, D., DE HAAS, P.E.; HERMANS, P.W.; VAN EMBDEN, J.D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods Enzymol**. 235:196-205, 1994.

VAN SOOLINGEN, D.; HAAS, P. E. W.; VAN DOORN, H.R.; KUIJPER, E.; RINDER, H.; BORGDORFF, M.W. 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, 2000.

VICTOR, T.C.; PRETORIUS, G.S.; FELIX, J.V.; JORDAAN, A.M.; VAN HELDEN, P.D.; EISENACH, K.D. *KatG* mutations in isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* are not infrequent. **Antimicrob Agents Chemother**, 40: 1572, 1996.

WENGENACK, N. L., UHL, J.R.; ST AMAND, A.L.; TOMLINSON, A.J.; BENSON, L.M.; NAYLOR, S.; KLINE, B.C.; COCKERILL III, F.R.; RUSNARK, F. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* katG (S315T) is a competent catalase-peroxidase with reduced activity toward isoniazid. **J Infect Dis**, 176: 722-727, 1997.

WHEELER, P.R.; ANDERSON, P.M. Determination of the primary target for isoniazid in mycobacterial mycolic acid biosynthesis with *Mycobacterium aurum* A+. **Biochem J**, 318: 451-457, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION REPORT, **Global Tuberculosis Control**, [Online]. <http://www.who.int/gtb/publications/globrep/index.html>, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, The WHO/IUALTD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. **Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World. Report no.2: Prevalence and Trends**. [Online]. <http://www.who.int/emc/amrtb.html>, 2002.

ZABINSKI, R.F.; BLANCHARD, J.S. The requirement for manganese and oxygen in the isoniazid-dependent inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase. **J Am Chem**, 119: 2331-2332, 1997.

ZHANG, Y.; GARBE, T.; YOUNG, D. Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. **Mol Microbiol**, 8: 521-524, 1993.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; YANG, D.; COLE, S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, 358: 591-593, 1992.

PUBLICAÇÃO

Trabalho publicado na revista International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases em janeiro 2005, p 87-93 (7)...

**PREVALENCE OF *katG* Ser315 SUBSTITUTION AND *rpoB* MUTATIONS IN
ISONIAZID-RESISTANT *Mycobacterium tuberculosis* ISOLATES FROM BRAZIL.**

C. C. Höfling¹, E. M. Pavan¹, C. M. S. Giampaglia², L. Ferrazoli², D. C. G. Aily², D. M. de Albuquerque³, M. C. Ramos¹.

¹ Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo;

² Instituto Adolfo Lutz, São Paulo; ³ Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

Running head: Tuberculosis and Isoniazid Resistance

Key words: Tuberculosis, Isoniazid, Rifampin, Resistance, *katG*, *rpoB*, RFLP.

SUMMARY

Setting: 468 isoniazid-resistant *M tuberculosis* isolates recovered from a selected population from Brazil. **Objective:** To check for susceptibility to other chemotherapeutic drugs used in TB treatment. To ascertain mutations involved in isoniazid and rifampin resistance. **Design:** Antimicrobial susceptibility to rifampin, streptomycin, and ethambutol was evaluated by the resistance ratio method and pyrazinamide by activity assay. SSCP, and sequence analysis were performed in samples from this panel, to confirm mutations in codon 315 of the *katG*, and in a 69bp region of the *rpoB* genes. **Results:** Combined resistance to isoniazid-rifampin, isoniazid-pyrazinamide, isoniazid-ethambutol, and isoniazid-rifampin-pyrazinamide was shown in 272 (58.1%), 126 (26.9%), 47 (10%), 116 (24.8%) isolates. No *katG* mutation was found in 19 strains (39.6%) out of 48 tested. Ser315Thr substitution was found in 29 (60.4%). All rifampin-resistant strains tested (=25) showed *rpoB* mutations. S531L substitution was found in 15 (60%). **Conclusion:** Isoniazid-resistant strains isolated from selected populations in Brazil frequently show resistance to other first-line anti-TB drugs. *rpoB* mutation was responsible for rifampin resistance in all strains. Among INHr strains, *katG* mutations were shown in only 60.4%. Genetic approaches targeting the *rpoB* gene, but not the *katG* gene have a high sensitivity to detect resistance among Brazilian *M.tuberculosis* strains.

INTRODUCTION

Mycobacterium tuberculosis is the causative agent of tuberculosis (TB) and one of the leading causes of death worldwide (1). AIDS pandemics, and the emergence of bacterial resistance to standard chemotherapeutic agents used in the treatment of TB have brought concern to developed and undeveloped world (2).

Large urban centers in Brazil show incidence rates of TB as high as 52.5/100,000 inhabitants. TB deaths 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 was 6.3% for isoniazid (INH), 2.9% for rifampin, 7.1% for streptomycin, 0.3% for ethambutol and 0% for pyrazinamide (4). In the year 2000 the estimated rate of multi-drug resistant tuberculosis for the whole country was 0.9% of all TB cases (5).

It has been previously shown that a complex array of mutations involving *katG*, *inhA*, *kasA*, *ndh*, and the *oxyR-ahpC* intergenic region are associated with INH resistance (6, 7, 8, 9), but extensive research revealed that *katG*, which encodes a catalase-peroxidase enzyme involved in the activation of the pro-drug isoniazid into its active form, is the major site of mutation. Furthermore, one particular amino acid substitution at codon 315 (Ser→Thr/AGC→ACC) is reported to be the most frequent (10, 11, 12, 13, 14, and 15). This substitution confers low catalase activity, such as to decrease the conversion of INH into isonicotinic acid, but keeps enough peroxidase activity to detoxify host antibacterial radicals (16, 17). Other mutations within the *katG* gene, or its complete deletion, are rare events (13, 9).

Mutations in *katG*, *inhA* and *ahpC* genes were reported in 69 isoniazid resistant (INHr) *M. tuberculosis* isolates recovered from patients residing in three Brazilian States.

Ser315Thr substitution was the most frequent, confirming previously published data from other countries (18).

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 (19), corresponding to codons 511 through 533. In Brazil, few sequencing or hybridization studies have focused this problem. S531L mutation was found in most rifampin resistant strains tested (20, 21, and 22)

Efforts to characterize antimicrobial resistance in *M. tuberculosis*, and mutations related to the *katG* and *rpoB* genes are critical to develop strategies targeting the control of disease and dissemination of resistant strains, as well as the development of new treatment regimens.

MATERIALS AND METHODS

***M. tuberculosis* isolates** – 468 isoniazid-resistant *M. tuberculosis* isolates recovered in the State of São Paulo, Brazil, from August, 1999 through September, 2000, sent to the ‘Instituto Adolfo Lutz’ [Central Laboratory, State Health Service] (462 isolates), and to a state university hospital in Campinas (=6 strains), were tested against Rifampin, Ethambutol, Streptomycin, and Pyrazinamide. The first laboratory is the institutional reference laboratory for the São Paulo State Health Services for *M. tuberculosis* drug susceptibility testing. Criteria for sending isolates to these laboratories were: treatment failure, re-treatment, HIV/TB co-infection, correctional institution cases, and disease among documented resistant patients’ contacts. Assuming that the overall incidence of TB in the State is 15,792 cases (3), the expected number of INHr isolates statewide was approximately 950 (4), during that period. Seven additional INHs isolates were included in the analysis for control purposes. Detailed information about drug resistance and number of isolates tested is shown in **table 1**. Data provided by this sample does not necessarily reflect the overall prevalence of resistance of *M. tuberculosis* to chemotherapeutic agents throughout the State. Due to economic reasons, not all isolates were analyzed.

Primary cultures were submitted to antimicrobial drug susceptibility testing. For further studies, isolates were re-cultivated on Löwenstein-Jensen (LJ) slants before preservation into Sauton broth added glass beads and stored in a temperature of –20 to –70°C. For genotyping, SSCP, and sequence studies, one bead was streaked out onto new LJ slants for growth.

Drug susceptibility testing- Drug resistance was tested by the resistance ratio method, for isoniazid (INH), rifampin (RIF), streptomycin (SM) and ethambutol (EMB). The drug concentration range used was 0.05 to 0.2 µg/ml for INH, 2.5 to 10 µg/ml for RIF, 0.62

to 2.5 µg/ml for EMB, and 3.12 to 12.5 µg/ml for SM. Resistance to pyrazinamide was determined by the pyrazinamide activity assay using the concentration of 100µg/ml (23).

DNA profiling – A sample of 83 INHr, and 2 INHs specimens, corresponding to isolates used in SSCP and sequencing studies, was also analyzed by IS6110 RFLP, using a method internationally standardized (24) to differentiate possible genotypic relationship. Comparison of DNA patterns was performed with GelCompar II, version 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Relatedness was calculated using Dice similarity coefficient with 2% band position tolerance. Cluster analysis was done by use of the unweighted pair-group average method.

PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis - Amplification of *katG*, and *rpoB* sequences was done in 88, and 78 isolates, respectively by adding 10ng of genomic mycobacterial DNA to primers previously described for *katG* (25, 26), and *rpoB* genes (27, 19), listed in **table 2**. Two distinct fragments from *katG* gene were amplified to confirm the presence of the region to be analyzed (codon 315): one consisting of 525 bp (from codon 243-418) and another with 376 bp (codon 243-368). For *rpoB* gene a 157-bp fragment was amplified. SSCP analysis was performed using the PCR products from 84 INHr, four INHs isolates, 53 rifampin resistant (RIFr), and 25 rifampin sensitive (RIFs) isolates using the GeneGel SSCP Kit (Amersham Pharmacia Biotech), as instructed by the manufacturer, at 5°C and pH 9.0.

DNA sequencing: Automatic DNA sequencer (ABI Prism 377, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), and BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), was used as instructed by the manufacturer. Sequences were analyzed using Chromas software (version 2.22- Technelysium Pty. Ltd.).

A Blast search was performed for nucleotide comparison (28). Based on previous SSCP analysis, 48 INHr and 2 INHs isolates for *katG* study, and 25 RIFr and 9 RIFs isolates for *rpoB* study were selected for sequencing.

RESULTS

Antimicrobial susceptibility tests revealed that 272 of 468 isolates (58.1%) were resistant to both isoniazid and rifampin (MDR). Simultaneous resistance to the standard TB treatment adopted in Brazil (INH/RIF/PZA) was seen in 116 isolates (24.8%). Concomitant resistance to isoniazid, rifampin and ethambutol, a nation-wide regimen used in the recent past was seen in 43 (9.2%) isolates (**table 1**). Resistance to any other drug used in the treatment of tuberculosis when isoniazid resistance is present was found in 295 isolates (63%). This data can only be generalized when dealing with populations sharing the same characteristics of the group analyzed in this work, as outlined earlier.

IS6110 RFLP was performed in 83 INHr, and 2 INHs isolates. Two isolates carried only two IS6110 copies. All other isolates exhibited more than five copies. Among 81 isolates, 8 clusters were found, consisting of 2 isolates each. One of the clusters consisted of specimens collected from first-degree relatives, indicating recent transmission. No obvious epidemiologic links could be found for the remaining 7 clusters. **Figure 1** shows RFLPs from two out of eight clusters found.

To characterize mutations in codon 315 of the *katG* gene, SSCP analysis was performed in 84 INHr and 4 INHs isolates. Twenty distinct electrophoretic patterns were obtained. For *rpoB* mutation detection, SSCP analysis was performed in 53 RIFr and 25 RIFs isolates. Nineteen distinct patterns were obtained from 5 electrophoresis sessions. **Table 3** shows the distribution of wild type and mutation patterns of SSCP according to sensitivity to INH and RIF. A representative number of specimens from each SSCP pattern obtained from both fragments, as well as all isolates exhibiting unique patterns, were selected for sequencing studies. **Figure 2** shows examples of SSCP patterns obtained in the study.

According to these criteria, a sample of 50 PCR products from *katG*, and 34 PCR products from *rpoB* was sequenced (table 1).

KatG mutations - The result of the sequencing studies from 48 INHr isolates is shown in **table 4**. No mutation was found in 19 (39.6%) INHr isolates, indicating that INH resistance was mediated by other mutation than codon 315 substitutions. The most prevalent mutation was G→C (Ser→Thr) substitution, found in 23 cases (47.9%). Four other mutations: Ser→Asn (AAC), Ser→Thr (ACA), Ser→Arg (AGA), Ser→Ile (ATC) were found in 6 cases (12.5%). Of the 50 PCR products sequenced, 34 had deviated SSCP patterns, including one INHs strain. SSCP was in concordance with sequencing in 82% of the cases. No statistical difference ($p>0.05$, chi-squared test) was found between MDR and non-MDR strains regarding the frequency of codon 315 mutations. No mutation in codon 315 was found in two INHs strains, taken as controls.

Two isolates, both INHr sharing the same genotype exhibited different sequence patterns. One isolate had a wild type sequence, while the other showed AGC→ACC substitution. Another pair of isolates, also INHr and sharing the same genotype, had different mutations; one carried the AGC→ACC, and one the AGC→AAC substitution.

RpoB mutations - Results of the sequencing studies of 25 RIFr isolates are shown in **table 5**. Among RIFr strains, the most prevalent mutations in a restricted region of the *rpoB* gene were as follows: Ser₅₃₁-15 (60%), His₅₂₆-6 (24%), Leu₅₃₃-1 (4%), Asp₅₁₆-1 (4%), and one insertion of two codons Phe₅₁₄, Met₅₁₅ (4%). An additional control sample of 9 RIFs isolates was sequenced, and no mutation in this region was found. Of the 34 PCR products sequenced, 30 had deviated SSCP patterns, including three RIFs strains. SSCP was in concordance with sequencing in 91.2% of the cases.

DISCUSSION

Tuberculosis control has been of worldwide concern because of its high incidence and the potential spread of drug resistant strains. Recent experiments have shown that INH induces several genes in *Mycobacterium tuberculosis* that encode proteins physiologically relevant to the drug's mode of action (29), as cited earlier. Rifampin is also a key component of tuberculosis chemotherapy. Resistance to this drug is found when *rpoB* gene undergoes mutations in a few described codons, belonging to an 81-nuclotide RIF resistance-determining region (RRDR). Substitution of key amino acids results in conformational changes and defective binding of the drug (30). In opposition to Isoniazid, few other genomic sites are ascertained as responsible for rifampin resistance.

The need to minimize the transmission of drug-resistant strains requires rapid identification procedures. The recognition of the exact mechanism involving INH resistance in several geographic *M. tuberculosis* subsets is essential to develop new and faster techniques, as well as to validate current methods that target mutations in the genomic sites of both *rpoB* and *katG*, which might be present at different settings.

Isoniazid - Resistance to this drug in Brazil is the second most common single drug resistance, after streptomycin. Even though resistance data provided by our work does not necessarily reflect the overall prevalence of resistance of *M. tuberculosis* to chemotherapeutic agents throughout the State, it can be generalized to populations sharing the inclusion characteristics of this sample. The number of isolates tested in the present study represents approximately 10% of the expected number of INHr isolates found in the same period statewide, according to previous studies, and 28% of isolates sent to the state reference laboratory for further tests.

The presence of mutations in codon 315 was found in 60.4% of the isolates, with high predominance of the ACC allele (79.3%). The prevalence of this substitution among INHr strains has been reported in 35% to 91% of isolates, depending on the geographic region studied (31, 12). ACC allele mutation in codon 315 also seems to be more frequent among resistant isolates to more than one drug and have higher MICs. In the Netherlands (15) only 33% of isolates exhibiting sole INH resistance ($0.5\mu\text{g/ml} < \text{MIC} < 1\mu\text{g/ml}$) showed this mutation, as opposed to 69% of isolates that carried no mutation in codon 315. Piatek et al. also described similar findings (32) with only 44% of monodrug INHr isolates showing this mutation. In Russia, (12) where MDR strains are predominant, codon 315 mutation was found in 91% of isolates, probably due to clonal dissemination since the majority of the isolates belonged to the Beijing family. Similar results were found in Latvia (33), although genotyping was not performed to assess clustering.

In our work, 57.9% of MDR, and 70% of sole INHr strains exhibited codon 315 mutations ($p > 0.05$). A significant amount of INHr strains (39.6%) did not harbor codon 315 mutations. A possible reason for this finding is that drug susceptibility testing for INH was carried out only to a MIC of $0.2\mu\text{g/ml}$. In this way, there might be included many strains with low level resistance to this drug.

Isolates included in this work had heterogeneous RFLP profiles, consistent with non-clonal dissemination of INHr strains. No correlation was found between RFLP profiles and resistance to isoniazid.

Rifampin - S531L was the most frequent mutation found among rifampin resistant strains investigated. Another study from Brazil (21, 22), performed in three different country regions, found this single mutation responsible for resistance in 50 to 56.2%, of the isolates. H526 locus was the second most prevalent mutation site in the present work as well as in

other Brazilian studies. Overall, mutations in this group of Brazilian isolates 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 isolate from our study had never been demonstrated before among Brazilian strains. This mutation was reported by Kapur (30) in an isolate from New York. Other investigators from developing countries also found Ser531 as the most prevalent mutation site involved in rifampin resistance. Mani et al. (34) observed it among 53% of RIFr isolates from several parts of India. In Mexico, Bobadilla-del-Valle et al. (27) reported 40% of RIFr isolates bearing mutations in this site. A wide range of frequencies for mutations within codons 531, and 526 have been reported worldwide. Ramaswamy and Musser (9) studying *M. tuberculosis* isolates 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.

The application of fast molecular techniques to detect mutations involved in *M. tuberculosis* resistance to first-line anti-TB drugs can improve the adjustment of treatment regimens, reduce the chances of clinical resistance, and prevent the transmission of drug resistant strains. Rapid identification techniques as PCR-restriction and Linear Probe Assays can be applied to Brazilian strains for fast determination of resistance to rifampin, as used by Oliveira et al. (20). These methods are expensive and cannot be used in routine testing. However, when dealing with selected populations as we did, rifampin resistance can be predicted with high sensitivity with the aid of techniques targeting *rpoB* mutations.

The same comment cannot be made for Isoniazid resistance, since many INHr strains did not harbor mutations in the *katG* gene.

REFERENCES

1. World Health Organization, Report 2003, Global Tuberculosis Control. 2003; [Online]. <http://www.who.int/gtb/publications/globrep/index.html>.
2. World Health Organization, The WHO/IUALTD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World. Report no.2: Prevalence and Trends. 2002; [Online]. <http://www.who.int/emc/amrtb.html>
3. Centro de Vigilância Epidemiológica. Reports on chronic diseases: tuberculosis. 2002; [Online]. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/Cve_tb.htm.
4. Cohn D, Bustreo F, Raviglione M C. Drug resistance in tuberculosis: review of the world-wide situation and WHO/IAUTLD global surveillance project. Clin Infect Dis 1997; 24 (Suppl 1): S121-130.
5. Dye C, Espinal M A, Watt C J, Mbiaga C, Williams B G. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. J Infect Dis 2002; 185: 1197-1202
6. Altamirano M, Marostenmaki J, Wong A, Fitzgerald M, Black W A, Smith J A. Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Infect Dis 1994; 169: 1162-1165.
7. Lee A S, Teo A S, Wong S Y. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(7): 2157-2159.
8. Lee A S G, Lim I H K, Tang L L H, Telenti A, and Wong S Y. Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:2087-2089.
9. Ramaswamy S, and Musser J M. Molecular genetic basis of antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 Update. Tuber Lung Dis 1998; 79: 3-29.
10. Abate G, Hoffner S E, Østergaard T V, Miörner H. Characterization of isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in *katG*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 329-333.
11. Mdluli K, Sherman D R, Hickey M J, et al. Biochemical and genetic data suggest that *InhA* is not the primary target for activated isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1996; 174: 1085-1090.
12. Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, Steklova L, Vyshnevskiy B. High prevalence of *katG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia, 1996 to 2001. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:1417-1424
13. Musser J M, Kapur V, Williams D L, Kreiswirth B N, van Soolingen D, van Embden J D A. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. J Infect Dis 1996; 173: 196-202.
14. van Doorn H R, Kuijper E J, van der Ende A, et al. The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg→Leu Mutation at codon 463 of *katG* are not associated. J Clin Microbiol 2001; 39: 1591-1594.

15. van Soolingen D, Haas P E W, van Doorn H R, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff M W. 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* 2000; 182:1788-1790.
16. Rouse D A, De Vito J A, Li Z, Byer H, and Morris S L. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol* 1996; 22: 583-592.
17. Wengenack N L, Uhl J R, St Amand A L, et al. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis katG* (S315T) is a competent catalase-peroxidase with reduced activity toward isoniazid. *J Infect Dis* 1997; 176: 722-727.
18. Silva M S, Senna S G, Ribeiro M O, et al. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003; 41(9):4471-4474.
19. 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* 1993; 37: 2054-2058.
20. Oliveira M M, da Silva, R A, Cardoso O M, et al. Rapid detection of resistance against rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Brazilian patients using a reverse-phase hybridisation assay. *J Microbiol Methods* 2003; 53: 335-342.
21. Spindola de Miranda S, Kritski A, Filiol I, Mabilat C, Panteix G, Drouet E. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Brazil and France. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 247-250.
22. Valim A R, Rossetti M L R, Ribeiro M O, Zaha A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3119-22.
23. Collins C H, Grange J M, Yates M D. Drug susceptibility tests. In: *Tuberculosis bacteriology: organization and practice*. 2nd ed. Butherworth-Heinemann, London, England 1997: pp 98-109.
24. van Soolingen D, de Haas P E, Hermans P W, and van Embden J D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* 1994; 235:196-205.
25. Rouse D A, and Morris S L. Molecular mechanisms of resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Infect Immun* 1995; 63: 1427-1433.
26. Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H, et al. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuber Lung Dis* 1998; 79: 111-118.
27. Bobadilla-del-Valle M, Ponce-de-Leon A, Arenas-Huertero J, et al. *rpoB* Gene Mutations in Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Identified by Polymerase Chain Reaction Single-Stranded Conformation Polymorphism. *Emerg Infect Dis*. 2001; 7: 1010-1013.
28. Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3389-402.
29. Ramaswamy S V, Reich R, Dou S J, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(4):1241-1250.

30. Kapur V, Li I, Iordanescu S, et al. 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 1994; 32: 1095-1098.
31. Ahmad S, Fares E, Araj G F, Chugh T D, Mustafa A S. Prevalence of S315T mutation within the *katG* gene in isoniazid-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Dubai and Beirut. Int J Tuberc Lung Dis 2002; 6(10):920-926.
32. Piatek A S, Telenti A, Murray M R, et al. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 103-110.
33. Tracevska T, Jansone I, Broka L, Marga O, Baumanis V. Mutations in the *rpoB* and *katG* genes leading to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. J Clin Microbiol 2002; 40: 3789-3792.
34. Mani C, Selvakumaar N, Narayanan S, Narayanan P R. Mutations in the *rpo*β gene multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. J Clin Microbiol 2001; 39: 2987-90.

Table 1. Antimicrobial susceptibility of 475 strains of *M. tuberculosis* isolates sent to the reference laboratories from 1999-2000 in São Paulo, Brazil, according to the number of isolates used for SSCP, and sequencing studies.

Drug resistance to	All tested	SSCP study		Sequence study	
		<i>katG</i>	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>rpoB</i>
I	173	19	17	10	4
R	1		1		1
I+R	137	32	28	20	12
I+P	7	-		-	-
I+E	1	-		-	-
I+S	10	2	2	-	1
I+R+P	76	19	15	11	8
I+R+E	13	2	2	2	1
I+P+S	2	-		-	-
I+S+E	2	-		-	-
I+R+P+E	22	6	5	4	2
I+P+S+E	1	-		-	-
I+R+P+E+S	8	1		1	-
I+R+P+S	10	2	2	-	1
I+R+S	6	1		-	-
No drugs	6	4	6	2	4
Total	475	88	78	50	34

Table 2: Primer sets used for amplification of the *katG* and *rpoB* fragments.

Gene	Primer	Sequence
<i>katG</i>	Rouse 5	5' CGCGGCGGTCGACATTCG 3'
	Rouse 6	5' GAACGGGTCCGGGATGGTG 3'
	HannaP6	5' CGGTGGATCAGCTTGTACCAG 3'
<i>rpoB</i>	TR9	5' TCGCCGCGATCAAGGAGT 3'
	TR8	5' TGCACGTCGCGGACCTCCA 3'

Table 3. Distribution of strains according to SSCP results and susceptibility profile to isoniazid and rifampin.

	SSCP		Total
	mutated	wild	
INHr	59	25	84
INHs	1	3	4
Total	60	28	88
RIFr	43	10	53
RIFs	13	12	25
Total	56	22	78

Table 4. Distribution of isolates according to *katG* codon 315 mutation found and their corresponding antimicrobial susceptibility profiles.

Mutation	Antimicrobial resistance						Total (%)
	I	I/R	I/R/ E	I/R/P	I/R/P/E	I/R/P/ E/S	
Ser→Thr (ACC)	5	7		7	3	1	23 (48%)
Ser→Asn (AAC)		1	1		1		3 (6.25%)
Ser→Thr (ACA)	1						1 (2.1%)
Ser→Arg (AGA)		1					1 (2.1%)
Ser→Ile (ATC)	1						1 (2.1%)
No mutation	3	11	1	4			19 (39.5%)
Total	10	20	2	11	4	1	48

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

Table 5. Distribution of isolates according to the *rpoB* mutation found and their antimicrobial susceptibility profiles.

Mutation	Antimicrobial resistance						Total (%)
	R	I/R	I/R/E	I/R/P	I/R/P/E	I/R/P/S	
S531L		7	1	5	2		15 (60%)
H526D	1	2		3			6 (24%)
H526Y		1					1 (4%)
L533P						1	1 (4%)
D516V		1					1 (4%)
Ins Phe ₅₁₄ , Met ₅₁₅		1					1 (4%)
Total	1	12	1	8	2	1	25

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

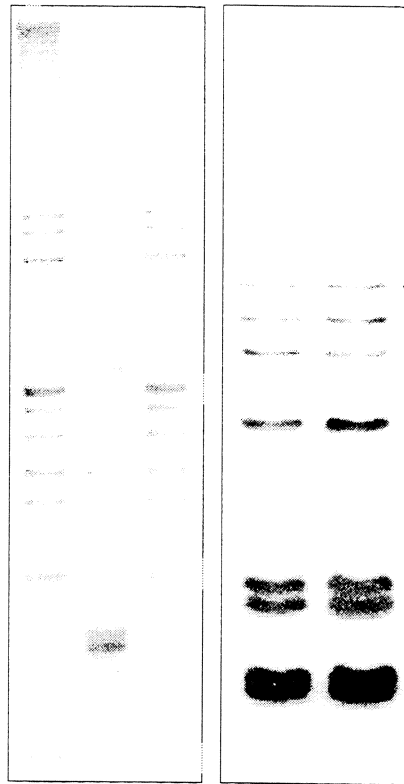


Figure 1: RFLP patterns from *M.tuberculosis* strains, showing identical genotypes.

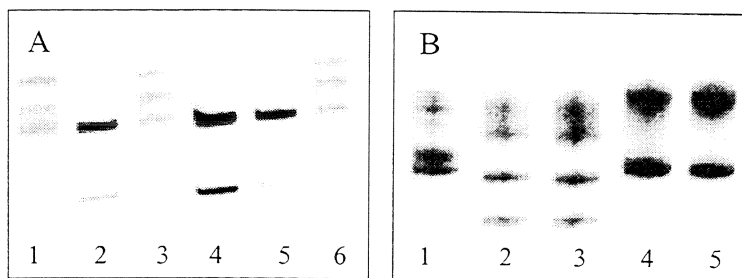


Figure 2: SSCP patterns from PCR products targeting *katG*, and *rpoB* genes from *M.tuberculosis* strains. **A (*rpoB* gene):** Lanes 1, 3 and 6 - RIFs/no mutation; Lanes 2, 4 and 5 - RIFr/codon 526 mutation. **B (*katG* gene):** Lane 1 - INHr/no mutation. Lanes 2 and 3 - INHr/ACC mutation. Lanes 4 - INHs/no mutation ; and Lane 5 - INHr/no mutation.