

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Estudo molecular da resistência à rifampicina do complexo
Mycobacterium tuberculosis numa população da Guiné-Bissau**

Ana Filipa Marques Alçada Sutre

Mestrado em Microbiologia Aplicada

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Estudo molecular da resistência à rifampicina do complexo
Mycobacterium tuberculosis numa população da Guiné-Bissau**

Ana Filipa Marques Alçada Sutre

Dissertação para obtenção do grau de Mestre orientada por
Doutora Susana David, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Prof. Doutora Sandra Chaves, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Mestrado em Microbiologia Aplicada

2010

AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer à Doutora Susana David que com enorme dedicação, disponibilidade e boa disposição contribuiu decisivamente para a elaboração desta tese de mestrado.

À Professora Doutora Sandra Chaves por ter aceitado co-orientar este trabalho e pelo apoio durante a elaboração da tese, nomeadamente na organização da informação e correcção dos textos.

Ao Dr. Vítor Henriques do Hospital de Cumura por toda a disponibilidade e contributo que deu para a realização deste trabalho, nomeadamente no fornecimento da informação sobre os indivíduos envolvidos no estudo.

Ao Dr. Alfredo Mané e Dr. Armando Sanca do Hospital de Cumura, pela colheita das amostras e respectivo tratamento.

Ao Professor Doutor Abílio Antunes, aposentado do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pela sua colaboração no projecto com a Guiné-Bissau.

Gostaria de agradecer à Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento por ter financiado parte do trabalho, a partir “Luso-American Collaborative Response Award on Tuberculosis program”.

À Doutora Elizabeth Pádua por toda a ajuda nas questões burocráticas e empréstimo de equipamentos.

Quero agradecer à Ana Cardoso que colaborou de forma extremamente empenhada e dedicada para a realização do trabalho laboratorial, nomeadamente na técnica de DHPLC durante a fase de optimização e também na análise de amostras.

Às técnicas do Laboratório da Tuberculose, Paula Cristóvão e Inês João, pelo apoio a nível laboratorial.

À Doutora Eleonora Paixão pela ajuda na realização do tratamento estatístico, pela simpatia e disponibilidade com que o fez.

À Dra. Luísa Sancho responsável do Laboratório de Bacteriologia do Hospital Amadora Sintra, agradeço a permissão para concluir o trabalho experimental.

Agradeço à Dra. Clara Portugal, do Laboratório de Bacteriologia do Hospital Amadora Sintra, toda a disponibilidade e apoio técnico prestado.

Gostaria também de agradecer de forma especial à Filipa Sena não só pela amizade demonstrada ao longo dos anos de curso, mas também o apoio e força que me transmitiu ao longo deste ano.

Ao Jorge pelo seu apoio incondicional.

Aos meus pais e irmão agradeço a imensa paciência, compreensão e carinho que sempre demonstraram.

RESUMO

A tuberculose é uma das doenças infecciosas mais antigas que afecta a ser humano. Segundo a Organização Mundial de Saúde, um terço da população mundial encontra-se infectada com o bacilo da tuberculose.

Os dados limitados sobre a resistência aos antibacilares em países em desenvolvimento ocorre, em parte, devido à carência de condições para efectuar cultura e testes de susceptibilidade aos antibióticos (TSA). Os métodos moleculares para a detecção de mutações, que conferem resistência aos antibióticos, têm sido considerados úteis nestes contextos, podendo ser realizados em colaboração com laboratórios com capacidade de efectua-los.

O estudo molecular foi realizado em amostras biológicas (expectorações) de doentes com diagnóstico presuntivo de tuberculose do Hospital de Cumura, na Guiné-Bissau.

Este estudo mostrou que o Método da Lixívia, utilizado no processamento das amostras, melhora a sensibilidade da microscopia e é compatível com posterior análise molecular, e que a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Resolução por Desnaturação (DHPLC), usada no rastreio rápido de mutações pontuais na região de 81pb determinante da resistência à rifampicina do gene *rpoB* (codifica para a subunidade β da RNA polimerase) de complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é útil na selecção de genótipos mutantes potencialmente resistentes. As mutações foram confirmadas por sequenciação, tendo os resultados revelado uma nova mutação S469L (27/94; 28,7%) e a mutação S531L (3/94; 3,2%), esta última implicada na resistência à rifampicina. Pelo teste GenoType® MTBDR_{plus}, foi detectada uma estirpe multirresistente.

Da análise de sequências correspondentes a estirpes de referência do GenBank, verificou-se que a mutação S469L está apenas presente na estirpe *Mycobacterium tuberculosis* K85. Não se sabe ainda, se esta mutação está associada a um fenótipo de resistência ou se será um possível marcador desta estirpe. Futuramente seria interessante realizar TSA e estudos genotípicos em estirpes com a mutação S469L.

Palavras-chave: Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, gene *rpoB*, Rifampicina, Resistência, DHPLC.

ABSTRACT

Tuberculosis is one of the most ancient infectious diseases affecting human beings. According to the World Health Organization, one third of the world population is infected with the tuberculosis bacillus.

There is limited data on antituberculosis drug resistance in developing countries. This is partly due to the lack of conditions to perform culture and drug susceptibility testing (DST). Molecular methods for the detection of drug resistance have been considered useful in these settings as these can be carried out in collaboration with laboratories having the capacity to perform these methods.

Molecular analysis was carried out on specimens from patients with presumptive diagnostic of tuberculosis of the Cumura Hospital in Guinea-Bissau.

This study shows that the Bleach Method, for processing specimens, improves the sensitivity of microscopy and can be used prior to molecular analysis and that Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC), used for the rapid screening of point mutations in the 81 pb rifampicin resistance-determining region of the *rpoB* gene (encoding the beta subunit of the RNA polymerase) of *Mycobacterium tuberculosis* complex, could be useful in selecting potentially resistant mutants. In this study, confirmation of the mutation was performed by sequencing and the results indicated a new mutation S469L (27/96; 28,7%) and mutation S531L (3/96; 3,2%), the latter known to confer rifampicin resistance. One multidrug-resistant strain was detected by Genotype[®] MTBDR*plus*.

The mutation S469L was only detected in the *Mycobacterium tuberculosis* K85 strain, by analysis of sequences corresponding to reference strains from GenBank. Thus, it is not known if it is associated or not to a resistant phenotype or if it is a possible marker of these strains. It would be interesting to perform further DST and genotyping studies on strains with the S469L mutation.

Key-Words: *Mycobacterium tuberculosis* complex, *rpoB* gene, Rifampicin, Resistance, DHPLC.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
I. INTRODUÇÃO	1
1. Breve História da Tuberculose	1
2. Epidemiologia	2
3. Género <i>Mycobacterium</i>	3
3.1 Características gerais	3
3.2 Taxonomia.....	5
3.3 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
3.3.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
3.3.2 <i>Mycobacterium africanum</i>	6
4. Sintomatologia e modo de transmissão	7
5. Patogenicidade	7
6. Tratamento	8
7. Resistência aos antibacilares	9
7.1 Rifampicina	10
7.2 Isoniazida	11
8. Diagnóstico	11
8.1 Cromatografia Líquida de Alta Resolução por Desnaturação	13
8.2 GenoType [®] MTBDR <i>plus</i>	15
II. OBJECTIVOS.....	16
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
1. Fluxograma de Actividades.....	17
2. População do Estudo.....	17
3. Isolados Clínicos Portugueses	17
4. Processamento das amostras	18
5. Pesquisa de bacilos álcool-ácido-resistentes.....	18
6. Extracção e quantificação do DNA.....	18

7. Amplificação do gene <i>rpoB</i>	19
8. Técnica de DHPLC.....	20
9. Purificação dos Produtos Amplificados	20
10. Sequenciação dos Produtos Purificados	21
11. Análise das Sequências	21
12. Teste GenoType® MTBDR <i>plus</i>	21
13. Tratamento Estatístico.....	21
IV. RESULTADOS.....	22
1. Caracterização da População em Estudo	22
2. Optimização da Técnica de PCR.....	23
3. Avaliação da aplicabilidade do Método da Lixívia.....	24
3.1 Sensibilidade da microscopia.....	24
3.2 Compatibilidade do Método da Lixívia com o diagnóstico molecular	25
4. Detecção de mutações no gene <i>rpoB</i> por DHPLC.....	26
4.1 Optimização	26
4.2 Detecção de Mutações nos Isolados Clínicos Portugueses	27
4.3 Detecção de Mutações nas Amostras do Hospital de Cumura	28
5. Confirmação das Mutações por Sequenciação	29
5.1 Isolados Clínicos Portugueses	29
5.2 Amostras do Hospital de Cumura	30
6. Mutação S469L	31
7. Pesquisa de Tuberculose Multirresistente	33
V. DISCUSSÃO	35
VI. CONCLUSÃO	41
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
VIII. ANEXOS	47

I. INTRODUÇÃO

1. Breve História da Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma das doenças infecciosas mais antigas que afecta o ser humano.

A tuberculose chegou a ser considerada, nas diversas civilizações antigas, como resultado de um castigo divino. No entanto, Hipócrates, no século IV a.C. (antes de Cristo), percebeu que a tuberculose era uma doença natural, e, devido ao esgotamento físico próprio da doença, passou a denominá-la de tísica usando o termo grego 'phtisis' para a definir (Smith, 2003).

Em 1546 foi referida pela primeira vez a noção de contágio da TB (Bloom & Murray, 1992), mas só em 1722 Benjamim Marten propôs a primeira explicação credível para a transmissão atribuindo-a a um microrganismo infeccioso. Em 1679 Franciscus Silvius descreveu a existência dos típicos nódulos da TB pulmonar, aos quais chamou 'tubercula' e observou a sua evolução para cavitações. No entanto muitos patologistas da época achavam que a TB era uma doença constitucional sob a forma de tumor ou uma glândula anormal e não infecciosa (Doetsch, 1978). Cerca de cem anos mais tarde, Villemin demonstrou o carácter infeccioso da tuberculose ao verificar que animais experimentais desenvolviam a doença quando inoculados com expectoração ou pus de doentes com TB (Bloom & Murray, 1992). A 24 de Março de 1882, Robert Koch conseguiu isolar o agente da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (ou bacilo de Koch), e concluiu que este só encontra condições óptimas para se reproduzir em organismos vivos e que a principal fonte de contágio é a expectoração dos doentes tuberculosos. Os seus critérios para provar esta associação foram adoptados e são conhecidos ainda hoje como os postulados de Koch: isolamento do microrganismo, cultura e reprodução da doença, por administração do microrganismo (Koch, 1932). Mais tarde, em 1890, Koch produziu a Tuberculina, inicialmente com fins terapêuticos, tendo-se no entanto mostrado mais útil como prova de diagnóstico indicativo da infecção, mas não de doença activa (Pina, 2000).

Um importante passo na prevenção da TB foi conseguido em 1921, quando o médico Albert Calmette, do Instituto Pasteur de Paris, e o jovem veterinário Camille Guerin, desenvolveram a vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guerin) a partir de culturas seriadas de *M. bovis* (Pina, 2000). No entanto, a doença permaneceu incurável até 1944, altura em que foi descoberta a estreptomicina por Selman A. Waksman, a partir do fungo *Streptomyces griseus* (Pina, 2000).

Nos anos seguintes descobriram-se novos antibióticos (isoniazida, rifampicina e pirazinamida), que quando utilizados em associação, permitiam a cura de quase todos os casos de TB, fazendo com que o problema mundial da TB estivesse em vias de resolução (Pina, 2000).

Porém, por volta dos anos 80, surgiu uma nova epidemia pelo VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana), o que levou ao aumento na incidência da TB em praticamente todos os países do mundo. (Pina, 2000). Também, a má gestão do tratamento da tuberculose devido ao uso indiscriminado de antibacilares, em desacordo com as directivas de um bom plano de controlo da TB, levaram ao aparecimento da tuberculose multirresistentes (TB-MR), ou seja, bacilos resistentes a pelo menos dois dos antibióticos mais efectivos no tratamento da tuberculose: isoniazida e rifampicina.

Perante estes dois cenários, a Organização Mundial de Saúde acabou por declarar em 1993 a doença como emergência mundial.

Em 2006 o mundo foi alertado para uma situação ainda mais grave, a tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR), que consiste na resistência à isoniazida e rifampicina, bem como a pelo menos um dos três antibacilares injectáveis de segunda linha (amicacina, canamicina, capreomicina) e a uma fluoroquinolona (WHO, 2008). Em resposta ao problema crescente da TB-MDR e da ameaça de uma epidemia de TB-XDR, a estratégia STOP TB tem sido revista para incluir o acesso universal ao diagnóstico e tratamento de todos os doentes com TB-MR em 2015 (WHO, 2006, Miotto *et al*, 2009).

2. Epidemiologia

A TB, sendo a principal causa de morte provocada por uma doença infecciosa curável, é um problema global cuja dimensão, em números absolutos, continua a crescer. As estimativas da OMS para 2007 sugeriam uma prevalência de 13,7 milhões, uma incidência (novos casos) de 9,3 milhões, estando 1,4 milhões (15%) co-infectados pelo VIH e 1,8 milhões de mortes. A maior parte dos novos casos, cerca de 83%, ocorreu na África Subsariana e no Sudeste Asiático, onde se encontram muitos dos países com maior carga de TB (Figura 1).

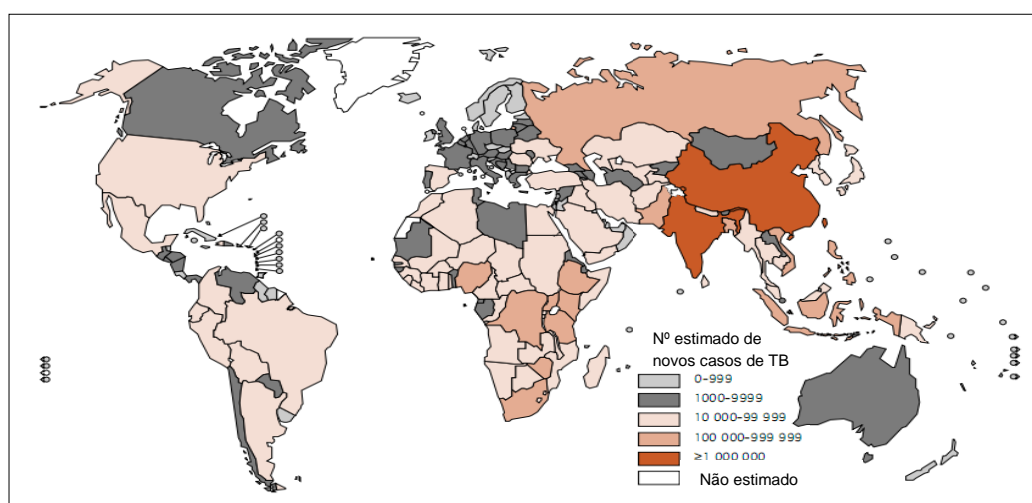


Figura 1 – Número estimado de novos casos (todas as formas) de tuberculose, por país, 2007 (adaptado do Global Tuberculosis Control, WHO Report 2009 - tabela A3.2)

A elevada incidência de TB em África (2,8 milhões) deve-se principalmente à também elevada incidência do VIH (1,1 milhões) nesta região. Esta combinação promove o desenvolvimento mais rápido da TB uma vez que a infecção por VIH, ao destruir as duas células mais importantes para a contenção do bacilo da tuberculose (macrófagos e linfócitos CD4+), contribui para a infecção da TB (Lienhardt & Rodrigues, 1997). A TB, sendo uma infecção oportunista, é a principal causa de morte nas pessoas infectadas com o VIH. Embora a pandemia VIH/SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) seja a principal causa para o aumento da prevalência de TB, existem outros factores que devem ser considerados, tais como o crescimento global da população e o aumento da sua longevidade, factores socioeconómicos e a deterioração das infra-estruturas de saúde pública.

A emergência de estirpes de *M. tuberculosis* multirresistentes veio agravar o problema de TB a nível mundial. Em 2007 foram registados cerca de meio milhão de casos de TB-MR, dos quais 30 000 correspondiam a novos casos de TB.

No contexto da União Europeia (UE), Portugal tem vindo a diminuir consistentemente a incidência da TB nos últimos cinco anos, em mais de 7%/ano (DGS, 2010). No entanto, permanece com um dos mais elevados índices de incidência da UE, tendo registado 30 casos/100 000 habitantes, no ano de 2007 (Tabela 1).

Relativamente aos países de língua portuguesa (PLP), estes representam, em conjunto, mais de 200 milhões de pessoas infectadas, estimando-se que tenham uma incidência de tuberculose 10 vezes superior à da União Europeia. Alguns milhões destas pessoas não têm acesso aos cuidados básicos de saúde nem estão ao alcance da ajuda humanitária externa. A pobreza e o baixo nível de desenvolvimento inviabilizam as vias clássicas de implementação da estratégia da OMS, cujos objectivos estão longe de ser atingidos. Entre os PLP, os dois mais populosos figuram na lista dos 22 países com maior carga de TB no mundo (“22 High Burden Countries”): Brasil (15º lugar) e Moçambique (19º).

Na Guiné-Bissau a tuberculose continua a ser um dos maiores problemas de saúde pública, tendo aumentado após a guerra civil (no período de 1998 a 1999). Em 2007, a Guiné-Bissau apresentou a terceira maior taxa de incidência anual de casos de TB entre os PLP (Tabela 1). Uma incidência tão elevada é devida a factores como más condições de alojamento das populações, falta de higiene básica, pobreza e falta de conhecimento dos riscos e métodos de prevenção da infecção.

Tabela 1 - Situação da Tuberculose nos países de Língua Portuguesa em 2007 (adaptado do Global Tuberculosis Control, WHO Report 2009 - tabela A3.2)

	Guiné-Bissau	Angola	Moçambique	Cabo Verde	São Tomé e Príncipe	Brasil	Portugal
Incidência TB (todos os casos/100000 habitantes)	220	287	431	151	101	48	30
Prevalência TB (todos os casos/100 000 habitantes)	276	294	599	280	240	60	23
Mortalidade (óbitos/100000 habitantes)	44	33	82	31	26	4	3
Prevalência do VIH nos casos novos de TB (%)	20	19	47	-	-	14	20
MDR nos casos novos (%)	2,3	1,8	3,5	1,6	-	0,9	0,9
MDR nos casos de retratamento (%)	9,2	9,2	3,3	11	-	5,4	9,3

- Valor não estimado

3. Género *Mycobacterium*

3.1 Características gerais

As micobactérias podem ser parasitas obrigatórios, saprófitos ou oportunistas. A maioria das espécies apresenta vida livre no solo ou na água, mas para muitas espécies o nicho ecológico preferencial são os tecidos de hospedeiros homeotérmicos, como é o caso de *M. tuberculosis*, cujo reservatório natural é o ser humano (Sousa *et al*, 2000).

As micobactérias são bactérias microaerófilas, imóveis, geralmente não capsuladas e não formadoras de esporos. Habitualmente a maioria das espécies apresenta uma morfologia bacilar, coco

bacilar ou mais raramente formas filamentosas. Caracteristicamente os bacilos são finos, rectos ou ligeiramente encurvados, apresentando-se isolados, aos pares ou em pequenos aglomerados (Sousa *et al*, 2000).

As diferentes velocidades de crescimento em meios de cultura específicos levam à tradicional classificação das micobactérias em dois grupos: micobactérias de crescimento rápido (como *M. abscessus*) e micobactérias de crescimento lento (como *M. tuberculosis*). Esta classificação distingue micobactérias que crescem em menos de sete dias, sem necessidade adicional de factores de crescimento, daquelas cujo crescimento ocorre depois de sete dias, com exigências nutritivas particulares. A temperatura óptima de crescimento varia consoante a espécie e pode ser entre 30°C e 45°C, e as variações de pH suportadas são limitadas entre 6 e 8, sendo o pH óptimo de 6,7 a 6,9 (Murray *et al*, 2006). O tipo de colónias que originam é variável, podendo tratar-se de colónias arredondadas de superfície lisa ou irregular, de aspecto seco ou húmido e de consistência mucóide (Wayne & Kubica, 1986).

As micobactérias possuem uma parede celular de composição química e estrutura complexas, particularmente rica em componentes lipídicos, que conferem uma barreira contra a acção dos agentes físicos e químicos do meio ambiente, contribuindo para a sua resistência a antibióticos utilizados correntemente na prática clínica (Murray *et al*, 2006).

A camada de peptidoglicano constitui um polímero que confere a forma à célula. Ligadas covalentemente ao peptidoglicano estão dois tipos de moléculas: arabinogalactanos e ácidos micólicos (Crick *et al*, 2001; Schroeder, 2002).

O arabinogalactano é um polissacárido complexo, composto por D-galactofuranoses (*galf*) e D-arabinofuranoses (*araf*), moléculas extremamente raras na natureza. Os ácidos micólicos, de enorme importância na classificação taxonómica das micobactérias, são ácidos gordos de elevado peso molecular (60 a 90 carbonos), com cadeias longas, α -ramificados e β -hidroxilados. Estes encontram-se ligados ao arabinano do arabinogalactano através de ligações éster (Schroeder, 2002). Os ácidos micólicos conferem hidrofobicidade à parede das micobactérias e são os principais responsáveis pela sua propriedade álcool-ácido resistência, que se traduz na dificuldade de coloração com carbol fucsina de Ziehl-Neelsen (coloração a quente), mas uma vez coradas, estas bactérias não são descoradas mesmo pela acção de ácido e de álcool (Murray *et al*, 2006) (Figura 2). A camada externa é composta por glicolípidos e ceras que pertencem a famílias quimicamente definidas: fosfatidil inositol manósidos (PIM), lipoarabinomananos (LAM), glicolípidos de trealose (lipooligossacáridos (LOS), sulfolípidos (SL), dimicolatos de trealose (TDM), glicolípidos fenólicos (PGL)) (Rastogi *et al*, 1991). Os componentes lipídicos e as proteínas constituem, respectivamente, 60% e 15% do peso da parede celular.

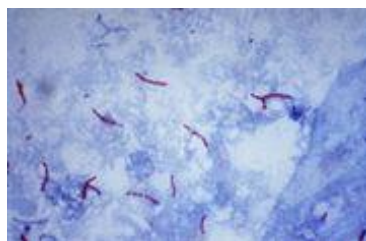


Figura 2 – Fotografia de microscopia óptica de *M. tuberculosis* corado pela coloração Ziehl-Neelsen (extraído de: www.wikilingue.com).

3.2 Taxonomia

Em termos taxonômicos, as micobactérias constituem um gênero único da família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales* e classe *Schizomycetes* (Wollinsky, 1990). O gênero *Mycobacterium* contém cerca de 120 espécies (Tortoli, 2006) e está filogeneticamente próximo dos gêneros *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, refletido no conteúdo em Guanina e Citosina (GC) que apresentam, e o facto de serem produtores de ácidos micólicos, embora com diferentes estruturas moleculares e de menor peso molecular (Rastogi *et al*, 2001).

Em 1959, Runyon propôs uma classificação para as micobactérias, agrupando-as com base em características fenotípicas, nomeadamente tempo de crescimento (micobactérias de crescimento rápido e de crescimento lento) e a produção ou não de pigmentos após exposição à luz e/ou na obscuridade, sendo ainda hoje utilizada (Runyon, 1959; Tortoli, 2006).

Actualmente, a definição do gênero *Mycobacterium* assenta sobre três critérios: (i) estrutura de ácidos micólicos, (ii) a álcool-ácido resistência dos bacilos e (iii) um conteúdo em guanina e citosina no DNA (ácido desoxirribonucleico) na ordem dos 62-70%, com excepção para *Mycobacterium leprae* que tem cerca de 58% (Rastogi *et al*, 2001).

3.3 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

As micobactérias reunidas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) são agentes patogénicos estritos, dependendo do hospedeiro para a sua sobrevivência. Este complexo integra várias espécies associadas à tuberculose humana e animal: *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluindo a estirpe vacinal BCG), *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, (Van Soolingen *et al*, 1997), *M. pinnipedii* (Cousins *et al*, 2003) e *M. caprae* (Aranaz *et al*, 2003). Destas espécies, as que têm como hospedeiro principal o Homem são: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*.

Geneticamente, todos os membros do CMTB partilham cerca de 99,9% de semelhança nucleotídica e apresentam sequências idênticas do gene *16S rRNA*. No entanto, são consideradas espécies distintas, porque diferem na variedade de hospedeiros, na sua patogenicidade, no fenótipo e na epidemiologia (Brosch *et al*, 2002).

Actualmente, Brosch propôs uma nova teoria de evolução para os membros deste complexo. Com base em estudos de genómica comparativa, analisou deleções irreversíveis de regiões cromossómicas. A ausência de um maior número de deleções irreversíveis corresponde a uma evolução mais recente relativamente ao ancestral. Assim, ao ter verificado que estas deleções apareciam em número muito superior no genoma de *M. bovis*, comparativamente aos restantes membros do complexo, sugeriu que este seria o último descendente na filogenia (Brosch *et al*, 2002). Vários estudos têm utilizado as deleções genómicas para a caracterização de isolados do CMTB (Salamon *et al*, 2000; Parsons *et al*, 2002).

3.3.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Entre as espécies do CMTB, *M. tuberculosis* é o agente responsável pela quase totalidade dos casos de TB em humanos.

M. tuberculosis apresenta-se como bacilo fino, imóvel e não esporulado e as suas extremidades são arredondadas (Sousa *et al*, 2000). O bacilo da tuberculose cresce lentamente a 37°C (4 a 6 semanas),

apresentando, em meio sólido, colónias esbranquiçadas, de aspecto rugoso, em couve-flor, caracterizando-se pela não produção de pigmento (não cromogénicas) (David *et al*, 1994; Sousa *et al*, 2000).

3.3.2 *Mycobacterium africanum*

M. africanum foi descrito em 1969 por Castets, Boisvert e Rist, embora a existência de uma variante africana do bacilo da tuberculose na Guiné-Bissau tivesse sido já assinalada em 1962, por David e Ramalho (David *et al*, 1994).

M. africanum compreende uma única espécie dentro do CMTB (Mostowy, 2004). O hospedeiro natural do *M. africanum* é o Homem, mas já foi isolado em primatas. A espécie *M. africanum* é geralmente limitada ao continente Africano. A menor frequência em que é isolada em comparação com o *M. tuberculosis* é um tema de investigação actual. A descoberta de casos em zonas não endémicas tem sido reconhecida como doença de importação.

As estirpes de *M. africanum* foram inicialmente caracterizadas com base em testes bioquímicos, ocupando uma posição intermédia entre o fenótipo de *M. tuberculosis* e o de *M. bovis* (Brosh *et al*, 2002; Mostowy *et al*, 2004). Deste modo, os isolados de *M. africanum* têm sido divididos em dois subtipos (I e II): *M. africanum* subtipo I, principalmente isolado em países da África Ocidental, apresentando características fenotípicas semelhantes a *M. bovis* e o subtipo II, reportado mais vezes nos países da África Oriental, considerado mais próximo de *M. tuberculosis* (Haas *et al*, 1997). Apesar dos métodos bioquímicos terem demonstrado ser uma ferramenta útil na diferenciação dos membros do CMTB, a distinção do *M. africanum* das restantes espécies do complexo requer uma análise genética. No estudo de Mostowy *et al* (2002), a distribuição das deleções genómicas sugeriu que isolados de *M. africanum* subtipo II pertenciam à espécie *M. tuberculosis*, sendo considerados uma variante fenotípica desta. Por outro lado, isolados de *M. africanum* subtipo I apresentavam dois padrões de deleções distintos, um caracterizado pela ausência da região RD9 e outro pela perda da região RD9 e das regiões RD7, RD8 e RD10 (Mostowy *et al*, 2002), Figura 3.

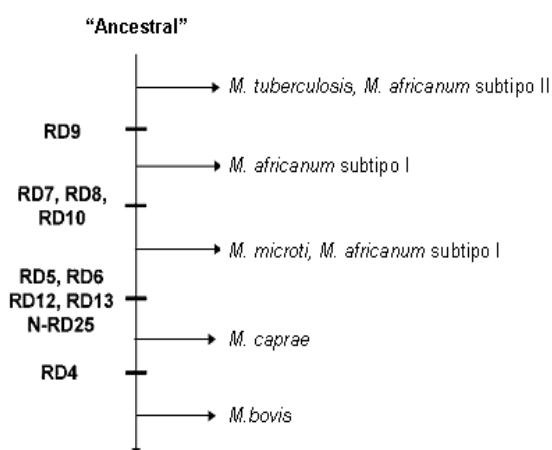


Figura 3 – Esquema evolutivo das espécies do CMTB, derivada da análise de deleções genómicas: RD (“region deleted”) e N-RD (“new region deleted”). O eixo vertical representa as regiões genómicas delectadas nos membros do CMTB. *M. tuberculosis* é caracterizado por não possuir as deleções genómicas e está próximo do ancestral do CMTB. *M. africanum* é caracterizado por não apresentar apenas um tipo de deleção (adaptado de Mostowy *et al*, 2002).

4. Sintomatologia e modo de transmissão

O quadro sintomatológico da TB pode aparecer de 4 a 12 semanas após infecção, variando conforme o sistema imunitário do indivíduo infectado e órgão do corpo afectado. No entanto, o quadro clínico da tuberculose é quase sempre insidioso e os sintomas inespecíficos, que incluem geralmente febre, emagrecimento, sudorese nocturna, astneia e perda de apetite. Pode no entanto haver indivíduos que apresentem poucos ou nenhum destes sintomas (Murray *et al*, 2006). No caso de se tratar de tuberculose pulmonar, os sintomas são geralmente tosse prolongada (por mais de 3 semanas), dores peitorais e raramente hemoptise (expectoração com sangue). Se, no entanto, a doença se desenvolver noutra órgão, os sintomas podem variar. Por exemplo, se houver infecção na coluna vertebral, os sintomas podem incluir dores ou deformações na coluna vertebral.

O modo de transmissão da doença ocorre na maioria dos casos por via aérea através da fala, espirro e principalmente da tosse de doentes de tuberculose, que lançam no ar gotículas contaminadas (aerossóis). Raramente por outras vias como inoculação directa ou ingestão de leite não pasteurizado (David *et al*, 1994).

5. Patogenecidade

A tuberculose caracteriza-se por apresentar elevadas taxas de infecção mas baixas taxas de incidência da doença, ou seja, existe um elevado número de indivíduos infectados, mas apenas 10 % desenvolve doença clinicamente activa. Metade destes desenvolverá tuberculose dois a três anos após infecção (tuberculose primária) e a outra metade apenas muitos anos mais tarde (tuberculose secundária ou pós-primária), devido à reactivação endógena de micobactérias que persistem em lesões residuais num estágio latente ou devido à reinfeção exógena (Kristski & Melo, 2007), Figura 4.

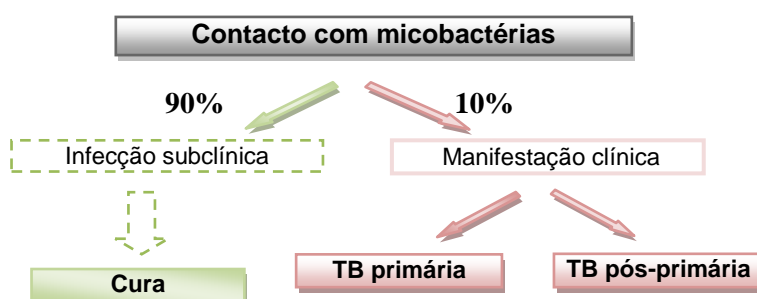


Figura 4 – Etapas de uma infecção por micobactérias.

A forma primária ocorre em indivíduos que ainda não tiveram contacto com o bacilo, normalmente em crianças. No processo de infecção, partículas aéreas (1 a 3 μm), contendo 1 a 10 bacilos, conseguem chegar ao espaço alveolar, geralmente no lóbulo pulmonar médio direito, imediatamente sob a pleura (David *et al*, 1986). Os bacilos infecciosos são fagocitados pelos macrófagos alveolares, e ao contrário de outras bactérias, *M. tuberculosis* impede a fusão do fagossoma com o lisossoma. Deste modo, não se gera um ambiente hostil de pH ácido, permitindo à bactéria sobreviver e replicar-se dentro do fagossoma. Os macrófagos infectados, através da produção de citocinas, atraem monócitos, linfócitos e neutrófilos inactivados, que auxiliam no controlo da infecção. A propagação da bactéria é geralmente contida à medida que a imunidade celular se desenvolve. Os macrófagos que contêm bacilos são mortos, formando-se o centro caseoso do granuloma (lesão típica da tuberculose),

rodeado por uma zona celular composta por fibroblastos, linfócitos e monócitos. Pensa-se que *M. tuberculosis* é incapaz de se multiplicar no interior dos granulomas, mas pode permanecer latente durante décadas. Se o indivíduo possuir uma imunidade celular eficiente, a infecção pode ser parada nesta fase, os granulomas cicatrizam resultando em pequenas lesões fibrosas e calcificadas. No entanto, se um indivíduo com uma infecção latente fica com o seu sistema imunitário enfraquecido, devido a infecção por VIH, fármacos imunossupressores, má nutrição, envelhecimento, pode ocorrer reactivação e o interior do granuloma liquefaz-se por um processo desconhecido e torna-se um meio rico para o crescimento de *M. tuberculosis*. Este líquido pode propagar-se pelos pulmões, causando tuberculose pulmonar activa, ou propagar-se para outros tecidos pela via sanguínea ou linfática causando tuberculose extrapulmonar. Nesta fase o indivíduo torna-se infeccioso e vai necessitar de uma terapia antibiótica adequada para sobreviver (Smith, 2003).

As localizações não pulmonares são muito variadas: meninges, ossos, articulações, gânglios, rins, supra-renais, órgãos genitais, pele entre outros. As formas mais graves de tuberculose humana são as tuberculoses respiratórias (pulmonares, brônquicas ou pleural), digestiva (peritonite tuberculosa), ósteo-articular, nervosa (meningite tuberculosa), genito-urinária e a sub-cutânea (Kristski & Melo, 2007).

A imunidade do hospedeiro é um factor crucial na reactivação da tuberculose, o que é demonstrado pelas diferentes taxas de reactivação em indivíduos imunocompetentes e em co-infectados por VIH. Assim, a taxa de reactivação dos indivíduos imunocompetentes é de 5-10% durante toda a vida. Nos indivíduos co-infectados por VIH a taxa de reactivação é de 7% por ano (Israel *et al*, 1941; Selwyn *et al*, 1989).

6. Tratamento

Os antibióticos anti-tuberculose são classificados, em função da sua actividade antimicobacteriana e da sua toxicidade, em antibacilares de primeira linha e de segunda linha. Os antibacilares de primeira linha são os primeiros a serem administrados a todos os novos casos de TB. Os de segunda linha são reservados ao tratamento dos doentes portadores de bacilos resistentes aos antibióticos de primeira linha ou a doentes que contenham alguma contra indicação à sua utilização. Actualmente existem cinco antibacilares de primeira linha: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, estreptomomicina e etambutol. Os agentes de segunda linha são vários, por exemplo a cicloserina, etionamida, ácido para-aminosalicílico, canamicina, e capreomicina. Existem também outros antibióticos mais recentes, para os quais a experiência clínica ainda é reduzida: alguns da família das fluoroquinolonas (ofloxacina, ciprofloxacina), algumas rifamicinas (rifabutina) e linezolid (David SB & David HL, 1998). Os fármacos de segunda linha apresentam três grandes desvantagens: são menos eficazes, são mais dispendiosos e provocam efeitos adversos com maior frequência (Campos, 2000).

O esquema terapêutico a usar no tratamento da TB deve ser escolhido tendo em consideração as características do quadro clínico, a co-existência de outras doenças, a capacidade do doente em aderir a uma terapêutica prolongada, história de tratamento prévio com antibacilares ou contacto próximo com doentes com TB-MR. O esquema terapêutico recomendado no tratamento de adultos com TB tem uma duração mínima de seis meses e compreende duas fases: a fase inicial (ou intensiva) para a rápida redução do número de micobactérias de localização intra e extracelular e

melhoria dos sintomas e a fase de continuação (ou manutenção) para eliminação dos bacilos residuais, prevenindo recidivas (Manjuba, 2007; Duarte *et al*, 2010), Tabela 2.

Tabela 2 – Esquema recomendado para o tratamento de tuberculose (adaptado de Duarte *et al*, 2010)

Tratamento da tuberculose de acordo com o grupo de diagnóstico		
Doentes	Regimes de tratamento	
	Fase intensiva	Fase Manutenção
Caso novo	2 meses HRZE	4 meses HR
Retratamento	2 meses HRZES + 1 mês HRZE	5 meses HRE
Retratamento após insucesso		

H – Isoniazida; R – Rifampicina; Z – Pirazinamida; E – Etambutol; S – Estreptomocina.

No tratamento de casos de TB-MR deve obter-se o historial da quimioterapia já previamente realizada. O novo tratamento deve incluir na fase intensiva (duração mínima de seis meses) pelo menos quatro fármacos aos quais a estirpe infecciosa é susceptível ou que nunca tenham sido administrados ao doente, um fármaco injectável e uma fluoroquinolona e na fase de continuação (duração de doze a dezoito meses) pelo menos três dos fármacos mais activos e melhor tolerados (Jawahar, 2004).

O factor mais importante para o sucesso do tratamento da TB é a sua adesão. Para tal a OMS recomenda o Tratamento Directamente Observado de Curta Duração (DOTS, “Directly Observed Therapy Short Course”). A estratégia DOTS baseia-se no diagnóstico mediante provas bacteriológicas e na incrementação da utilização de regimes de tratamento num ambiente de apoio assistencial para os doentes, com toma directamente observada de forma a maximizar a adesão e reduzir o aparecimento de resistências aos antibióticos (WHO, 2006)

Na Guiné-Bissau, para garantir o cumprimento do tratamento e por problemas sociais e nutricionais, o Programa Alimentar Mundial (PAM) fornece bens de consumo aos doentes, incentivando o não abandono do tratamento (Manjuba, 2007).

7. Resistência aos antibacilares

O mecanismo mais frequente de resistência aos antibióticos é a presença, em plasmídeos, de genes que controlam a síntese de enzimas modificadoras dos antibióticos, tornando-os inactivos na sua acção antimicrobiana. Em *M. tuberculosis* não foram descobertos plasmídeos de resistência (David, 1970), sendo o único mecanismo conhecido de resistência adquirida aos antibacilares a aquisição de mutações em genes cromossómicos, que vão alterar o alvo do antibiótico. Na Tabela 3 estão representados alguns dos genes associados à resistência aos antibacilares.

Distinguem-se dois tipos de resistência clínica: a resistência primária, conceito de natureza epidemiológica definida como a presença de bacilos resistentes em doentes com TB recentemente diagnosticados e que não receberam tratamento e resistência adquirida, resultado de uma selecção de mutantes sob pressão antibiótica, surgindo no caso de um tratamento mal conduzido (David, 1970).

Tabela 3 - Antibióticos e os seus genes alvo e mutações associadas à resistência dos antibióticos (adaptado de Drobniewski & Wilson, 1998)

Antibiótico	Alvos prováveis	Mutação no gene que confere resistência	Função do gene
Rifampicina	Síntese de RNA	<i>rpoB</i>	RNA polimerase dependente de DNA
Isoniazida	Biossíntese de ácidos micólicos	<i>katG</i> <i>inhA/mabA</i> <i>ahpC</i> <i>oxyR</i>	Catalase-peroxidase Biossíntese de ácidos gordos Alcil-hidroperoxidase redutase C Regulador do stress oxidativo
Pirazinamida	Pirazinamidase (Pzase)	<i>pncA</i>	Pzase/Nicotinamidase
Estreptomina	Síntese proteica	<i>rrs</i> <i>rpsL</i>	rRNA 16S Proteína ribossomal S12
Etambutol	Síntese parede celular	<i>embA, B, C</i>	Síntese do lipoarabinomananos e arabinogalactanos
Etionamida	Síntese parede celular	<i>inhA + ?</i>	Resistência cruzada associada a mutações no gene <i>inhA</i>
Ciprofloxacina	Síntese DNA	<i>gyrA, gyrB, nor</i>	DNA girase subunidade A e B

7.1 Rifampicina

A rifampicina (RIF) é um derivado semi-sintético da rifamicina tendo sido introduzida na terapêutica da tuberculose em 1967 (Coll, 2003). É um antibiótico muito activo contra *M. tuberculosis*, uma vez que apresenta uma boa difusão através da parede celular hidrofóbica. O seu modo de acção consiste na inibição da síntese de RNA mensageiro, inviabilizando a transcrição génica (Miller *et al*, 1994).

A rifampicina apresenta uma actividade bactericida bastante eficaz, com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 0,1 a 0,2 µg/ml, possuindo uma excelente eficácia contra bactérias em estado latente ou com crescimento intermitente (Coll, 2003).

A rifampicina foi descoberta em 1965 e, devido à sua actividade bactericida, tornou-se um antibacilar fulcral na estratégia global DOTS da OMS de combate à tuberculose.

Em *M. tuberculosis* a resistência à rifampicina ocorre devido a mutações espontâneas que ocorrem numa frequência de 10^{-9} no gene *rpoB*, cujo produto génico é a subunidade β da RNA polimerase (Mani *et al*, 2001; Suresh *et al*, 2006). Cerca de 96% das estirpes resistentes à rifampicina possuem mutações que resultam na alteração de aminoácidos numa região central, bem definida, composta por 81 par de bases (pb). Esta zona é designada por região determinante de resistência à rifampicina do gene *rpoB* (RRDR, "Rifampicin Resistance-Determining Region"), e está compreendida entre os codões 507 a 533 (sistema de numeração de aminoácidos de *Escherichia coli*) (Telenti *et al*, 1993; Mani *et al*, 2001).

Estudos baseados na sequenciação de DNA já identificaram 75 mutações pontuais, 13 deleções e 4 inserções na RRDR (Figura 5) (Van De Zanden *et al*, 2003). No entanto, têm sido reportadas mutações fora da RRDR que também conferem resistência, mas com uma frequência inferior a 2% (Heep *et al*, 2001).

507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533
GGC	ACC	AGC	CAG	CTG	AGC	CAA	TTC	ATG	GAC	CAG	AAC	AAC	CCG	CTG	TCG	GGG	TTG	ACC	CAC	AAG	CGC	CGA	CTG	TCG	GCG	CTG
Gli	Tre	Ser	Gln	Leu	Ser	Gln	Fen	Met	Asp	Gln	Asn	Asn	Pro	Leu	Ser	Gli	Leu	Tre	His	Lis	Arg	Arg	Leu	Ser	Ala	Leu
	AGC Ser			CCG Pro	AGG Arg	CCA Pro			GTC Val	DEL	CAC His				TTG Leu				TAC Tir				TTG Leu	GCA Ala	CCG Pro	
				ATG Met		CTA His			TAC Tir										GAC Asp				TGG Trp			
						AAA Lis			GAG Glu										CGC Arg							
									GGC Gli										CTC Leu							
									GTC Ala										CAA Glu							
									AAC Asn																	
									TTC Fen																	

Figura 5 – Representação de algumas variantes alélicas na região de 81 bp do gene *rpoB* envolvidas na resistência à rifampicina. Os números 507-533 correspondem à posição dos aminoácidos na RNA polimerase de *E. coli*. (DEL- deleção) (adaptado de Mani *et al*, 2001 e Van Der Zanden *et al*, 2003).

Geralmente a resistência à RIF pode ser utilizada como um marcador para a multirresistência, uma vez que mais de 95% dos isolados resistentes à RIF também apresentam resistência à INH (Ewen *et al*, 2000). As mutações mais comuns (65-88%) ocorrem no codão 526 ou 531 e conferem um elevado grau de resistência (CMI > 32 µg/ml) (Macedo *et al*, 2009). Mutações nos codões 511, 516, 518 e 522 causam por outro lado um grau de resistência baixo (Somoskovi *et al*, 2001; Coll, 2003).

7.2 Isoniazida

A isoniazida (INH) é um pró-fármaco que requer activação enzimática para se tornar activo. *In vitro*, esta activação, efectuada por uma catalase-peroxidase, resulta numa espécie altamente reactiva com elevado poder oxidativo (Coll, 2003). O mecanismo pelo qual ocorre resistência à isoniazida é muito complexo e tem sido atribuído a mutações individuais em inúmeros genes (Tabela 2). Diversos estudos têm demonstrado que as mutações no gene *katG* são responsáveis pela resistência na maior parte dos casos (Macedo *et al*, 2009). Destes, a maioria apresenta a mutação S315T, que reduz em 50% a actividade da enzima catalase-peroxidase e, conseqüentemente, a capacidade de activação da isoniazida. De acordo com vários autores, o segundo gene mais frequentemente envolvido na resistência à isoniazida é o gene *inhA* (cerca de 25% dos casos), que codifica para a enzima enoil-ACP redutase, sobre expressa no caso de mutação, normalmente na região reguladora do gene (Macedo *et al*, 2009). No entanto, em isolados de *M. tuberculosis* em Portugal tem-se verificado exactamente o oposto, sendo a região promotora do gene *inhA* responsável pela maioria dos casos de resistência à isoniazida (Macedo *et al*, 2007).

8. Diagnóstico

O diagnóstico da TB ocorre geralmente em duas fases: diagnóstico inicial e o diagnóstico definitivo (Soini & Musser, 2001). O diagnóstico inicial é baseado em dados clínicos, por avaliação do historial do doente e do seu estado físico e laboratoriais através da microscopia para pesquisa de bacilos

álcool-ácido-resistentes (BAAR) em esfregaços realizados a partir de amostras clínicas, coradas pelas técnicas de Ziehl-Neelsen ou Auramina (as técnicas mais utilizadas).

Também são importantes para o clínico uma radiografia ao tórax para visualização de possíveis cavitações, a prova da tuberculina de Mantoux (comparando com os registos anteriores constantes do boletim de vacinas) e mais recentemente o teste IGRA (“Interferon Gamma Release Assays”), útil no diagnóstico da tuberculose infecção e latente.

O diagnóstico definitivo assenta no isolamento de *Mycobacterium* spp. em cultura, sendo necessário cerca de 3 a 8 semanas de incubação em meio sólido até que se visualizem colónias (Soini & Musser, 2001)

M. tuberculosis pode infectar qualquer órgão pelo que a pesquisa de micobactérias deve ser realizada em amostras dos órgãos envolvidos, tais como expectoração ou secreções brônquicas, medula óssea, sangue, urina, líquido cefalorraquidiano ou fragmentos de tecidos obtidos por biopsia (fígado, gânglios, pleura, baço, osso).

O processamento laboratorial do material biológico inclui homogeneização/liquefacção, descontaminação e concentração. A descontaminação serve para eliminar outras bactérias que possam estar presentes no produto a analisar e que, por crescerem mais rapidamente, impedem o crescimento de micobactérias. A concentração, feita por centrifugação, destina-se a aumentar a sensibilidade da microscopia e do exame cultural (Sousa *et al*, 2000).

No quadro deste estudo os métodos de processamento da amostra usados foram: Método da Lixívia (“Bleach Method”) e Método N-acetil-L-cisteína-Hidróxido de Sódio (NALC-NaOH). O Método da Lixívia é uma técnica simples e pouco dispendiosa. O hipoclorito de sódio é um desinfetante potente que permite destruir as micobactérias, reduzindo o risco de infecção dos profissionais, mas ao mesmo tempo inviabiliza a posterior obtenção de cultura (Ängeby *et al*, 2004). Este método, por também possuir uma etapa de concentração, tem se revelado eficaz no melhoramento da sensibilidade da microscopia (Ängeby *et al*, 2004, Bonett *et al*, 2007). O Método NALC-NaOH é compatível com a realização de posterior cultura e utiliza N-acetil-L-cisteína como agente mucolítico, que nas concentrações de 0,5 a 2% pode rapidamente digerir uma expectoração em 2 minutos, e o hidróxido de sódio como descontaminante. Este método apresenta como desvantagem o período curto de vida (apenas 24 horas) do reagente de trabalho NALC-NaOH (Master, 2004).

Para a cultura destes microrganismos existem meios sólidos (Lowenstein-Jensen, Stonebrink, Middlebrook 7H10 e 7H11) e líquidos (Middlebrook 7H9, constitui a base dos meios utilizados nos sistemas automatizados de monitorização do crescimento das micobactérias) específicos para o isolamento de micobactérias. O mais frequentemente utilizado na rotina laboratorial é o meio de Lowenstein-Jensen, meio à base de ovo e contendo verde de malaquite como agente inibidor (Sousa, 2000). Actualmente, existem novas metodologias, como métodos radiométricos e fluorométricos, que utilizam meios líquidos de cultura com os quais é possível detectar o desenvolvimento bacteriano em cerca de 7 a 14 dias (Sousa *et al*, 2000).

Perante a emergência de estirpes TB-MR e TB-XDR e o aumento da TB, a OMS tem alertado para a importância de um diagnóstico rápido e preciso, bem como um tratamento efectivo da TB. Em

particular, os avanços nas técnicas de biologia molecular têm contribuído para o surgimento de novos testes de diagnóstico rápidos e sensíveis.

Os métodos genotípicos têm a potencialidade de serem aplicados directamente na amostra biológica do doente, sem se recorrer a cultura, e combinam três fases: preparação das amostras para libertação do DNA das micobactérias; amplificação de um fragmento relevante do gene pela técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) e detecção de mutações por comparação da região equivalente na estirpe selvagem (Drobniewski & Wilson, 1998).

Os métodos moleculares que têm sido usados no estudo da susceptibilidade aos antibióticos (através da detecção de mutações em genes que conferem resistência) em micobactérias incluem: sequenciação de DNA, análise de heteroduplexes, ensaios de hibridação em fase sólida (por exemplo, “Line Probe Assay”), PCR-SSCP (Polimorfismos de Conformação em Cadeia Simples) (Drobniewski & Wilson, 1998), PCR em Tempo Real (“Real Time PCR”) (Yip *et al*, 2006).

No presente estudo recorreu-se à técnica de Cromatografia Líquida de Alta Resolução por Desnaturação (DHPLC, “Denaturing High-Performance Liquid Chromatography”) e posterior sequenciação do DNA para pesquisa de mutações no gene *rpoB*, com o intuito de avaliar a resistência à rifampicina nos doentes com suspeita de tuberculose, provenientes do Hospital de Cumura na República da Guiné-Bissau. A resistência à isoniazida foi analisada através do teste GenoType® MTBDR_{plus} (Hain Lifescience, Nehren, Alemanha) no sentido de avaliar a taxa de TB-MR nestes doentes. Deste modo, apenas serão descritas em detalhe estas duas técnicas moleculares.

8.1 Cromatografia Líquida de Alta Resolução por Desnaturação

A técnica de DHPLC é relativamente recente, tendo sido descrita inicialmente em 1998 como um método de análise de heteroduplexes mediado pela temperatura (TMHA) (Oefner & Underhill, 1998).

Em 2002, Cooksey *et al* utilizaram pela primeira vez em *M. tuberculosis* o método de DHPLC na detecção de mutações em genes associados à resistência aos antibacilares (Cooksey *et al*, 2002).

O princípio do DHPLC consiste na detecção de eventuais mutações pela formação de heteroduplexes de DNA, revelando-se eficaz no rastreio de mutações (Cooksey *et al*, 2002; Shi *et al*, 2006; Yip *et al*, 2006; Evans *et al*, 2008), tendo já sido aplicada a vários genes como *rpoB*, *katG*, *embB*, *rpsL*, *pncA*, *gyrA* (Cooksey *et al*, 2002, Shi *et al*, 2006).

Esta técnica pode ser dividida em duas etapas: formação dos homoduplexes e heteroduplexes de DNA e detecção dos mesmos, após extração do DNA e reacção de PCR. A primeira etapa consiste na mistura dos produtos PCR da amostra a ensaiar com o correspondente da estirpe selvagem,. A mistura é colocada num termociclador, onde sofre desnaturação (96°C durante 3 minutos) e posterior arrefecimento lento e progressivo para novo emparelhamento das cadeias de DNA. O resultado é quatro tipos de cadeias de DNA presente na amostra. Duas representam os dois homoduplexes formados por emparelhamento perfeito das cadeias complementar e reversa (25% cada) e as outras duas representam dois heteroduplexes formados por emparelhamento da cadeia complementar de cada homoduplexe com a reversa do outro homoduplexe (25% cada), sendo uma das cadeias “normal” e a outra com alteração (Figura 6).

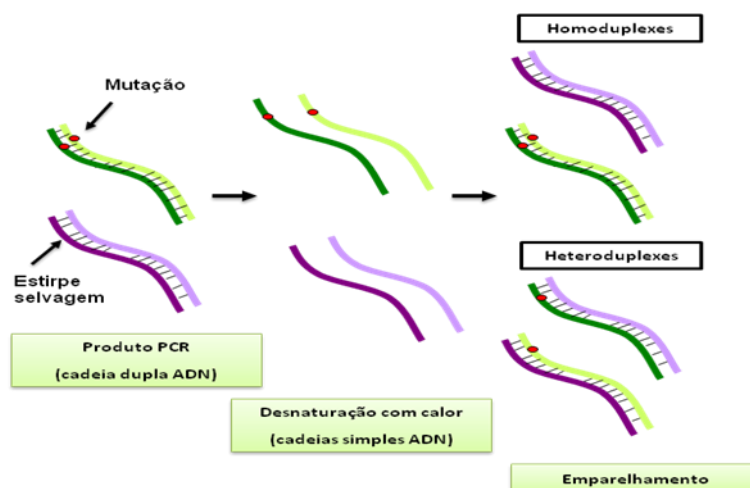


Figura 6 – Esquema da formação dos homoduplexes e heteroduplexes de DNA.

Na segunda etapa, para a detecção dos homoduplexes e heteroduplexes de DNA formados, os fragmentos de DNA passam numa coluna de cromatografia líquida de fase reversa, sob condições de desnaturação parcial. A matriz da coluna (fase estacionária) contém partículas hidrofóbicas de poliestireno, com 2-3 μm de diâmetro, que ficam carregadas positivamente pela passagem do tampão A, constituído por acetato de trietilamônio (TEAA) a 0,1 M, permitindo a ligação dos ácidos nucleicos carregados negativamente devido aos seus grupos fosfato (Xiao & Oefner, 2001). A eluição das moléculas de DNA é feita pela passagem do solvente orgânico denominado tampão B, constituído por TEAA a 0,1 M e 25% de acetonitrilo (ACN), que diminui a atracção entre os fragmentos de DNA e os íons de trietilamônio. Os heteroduplexes e homoduplexes são detectados por espectrofotometria por absorção de UV (ultravioleta) a 260 nm, cujo resultado é um cromatograma (Cooksey *et al*, 2002). Em cada cromatograma é possível identificar três zonas correspondentes à injeção das amostras, ao perfil da amostra (onde se detectam as alterações) e à lavagem da coluna.

Os homoduplexes e heteroduplexes são distinguidos através dos perfis obtidos nos cromatogramas (absorvância em função do tempo) e dos tempos de retenção. Os heteroduplexes são eluídos mais cedo (menor afinidade) e apresentam, teoricamente, quatro picos nos seus perfis. Por vezes, pode acontecer só ser possível distinguir dois ou três picos, em contraste com os correspondentes homoduplexes que apresentam apenas um pico nos seus perfis, sendo mais estáveis (Xiao & Oefner, 2001; Cooksey *et al*, 2002).

Relativamente ao tipo de perfil para cada mutação, normalmente obtêm-se diferentes cromatogramas para diferentes mutações (Xiao & Oefner, 2001).

A temperatura óptima da coluna que permite a detecção das mutações pode variar entre os 48^oC e os 68^oC para sequências ricas em Adenina e Timina (AT) e em GC, respectivamente. A temperatura pode ser determinada empiricamente ou por meios computacionais através do programa analítico WAVEmarker Software (Transgenomic, Inc.).

Nos últimos anos têm aparecido diversos artigos que documentam a óptima sensibilidade e especificidade da técnica de DHPLC na detecção de mutações, permitindo analisar fragmentos cujo tamanho pode variar entre os 150 e 700 pb (par de bases) (Xiao & Oefner, 2001).

Esta técnica apresenta como principais vantagens: ser uma técnica rápida (o WAVEsystem tem a capacidade de analisar mais de 100 amostras em 24h); por ser pouco dispendiosa em comparação com a técnica de sequenciação de DNA, apesar do investimento inicial ser elevado; ser versátil, na medida que permite analisar no mesmo aparelho amostras de vários organismos; apresentar uma elevada sensibilidade e especificidade; permitir um alto grau de automação e não requerer nenhum tratamento especial do produto de PCR (Xiao & Oefner, 2001; Cooksey *et al*, 2002; Shi *et al*, 2006; Evans *et al*, 2008).

8.2 GenoType® MTBDRplus

O teste GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Alemanha) é baseado na tecnologia DNA.Strip® e no princípio da hibridação reversa, permitindo a identificação molecular do complexo *M. tuberculosis* e da resistência à rifampicina (genes *rpoB*) e/ou isoniazida (genes *katG* e *inhA*) a partir de amostras cultivadas ou amostras clínicas pulmonares com microscopia positiva.

Cada tira do teste MTBDRplus® contém 27 sondas (Figura 6), incluindo 6 controlos de amplificação e hibridação (CC, UC, TUB, *rpoB*, *katG* e *inhA*) que permitem verificar se o ensaio correu de forma adequada. Para a detecção da resistência à rifampicina, existem oito sondas do tipo selvagem (WT – wild type) que abrangem a região 504-533 do gene *rpoB* e as sondas MUT1 (D516V), MUT2A (H526Y), MUT2B (H526D), e MUT3 (S531L) para as mutações mais comuns associadas ao fenótipo resistente. Para a detecção da resistência à isoniazida, analisaram-se os genes *katG* e *inhA*. Para o gene *katG* existe uma sonda do tipo selvagem para a região S315 (AGC) e as sondas MUT T1 (ACC) e MUT T2 (ACA) para as mutações S315T. A região promotora do gene *inhA* compreende as regiões entre as posições 9 a 22 para a sonda do tipo selvagem 1 (WT1) e as posições 1 a 12 para a sonda do tipo selvagem 2 (WT2). As sondas MUT1, MUT2, MUT3A e MUT3B permitem avaliar quatro mutações no gene *inhA* (C15T, A16G, T8C e T8A). As resistências à isoniazida e à rifampicina são detectadas, por ausência de sinal numa sonda do tipo selvagem (WT) e/ou no aparecimento de sinal numa sonda mutante.

Um estudo recente revelou que o teste GenoType® MTBDRplus apresenta uma sensibilidade de 98% na detecção de resistência à rifampicina e de 89% na detecção de resistência á isoniazida e uma especificidade de 99% para ambos os antibacilares (Ling *et al*, 2008). No entanto, este teste apenas abrange as mutações descritas como as mais frequentes (Boonaiam *et al*, 2010).

O procedimento divide-se em três passos: extração de DNA das amostras; amplificação por PCR multiplex (realizado com conjuntos de “primers” marcados com biotina) e hibridação reversa. A hibridação reversa envolve a desnaturação química dos produtos de amplificação, hibridação entre os produtos de PCR (em cadeia simples e marcados com biotina) e as sondas específicas, que se encontram numa membrana de nitrocelulose (Figura 7).

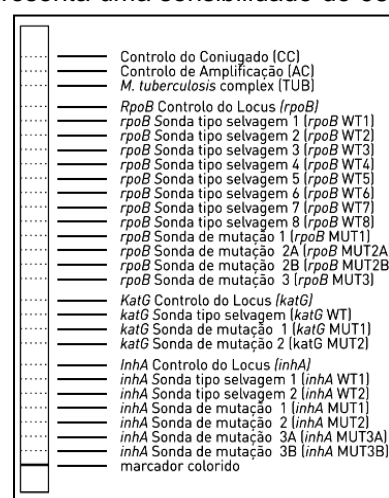


Figura 7 – Tira de nitrocelulose contendo 27 sondas para os genes alvos e específicos (extraído de: www.tb.evidence.org/documents/rescencetre/sob/MTBDRPLUS.pdf)

II. OBJECTIVOS

Na viragem do século XX para o XXI e devido a uma situação criada pelo Homem (tratamentos mal prescritos, deficiente qualidade dos fármacos e má adesão dos doentes, ao longo dos anos) surgiu a tuberculose multirresistente (TB-MR). Assim, a detecção precoce da resistência aos antibióticos (rifampicina e isoniazida) directamente a partir de amostras respiratórias, é essencial para que se assegure o tratamento atempado, adequado e eficaz da tuberculose, bem como para prevenir a disseminação de casos TB-MR.

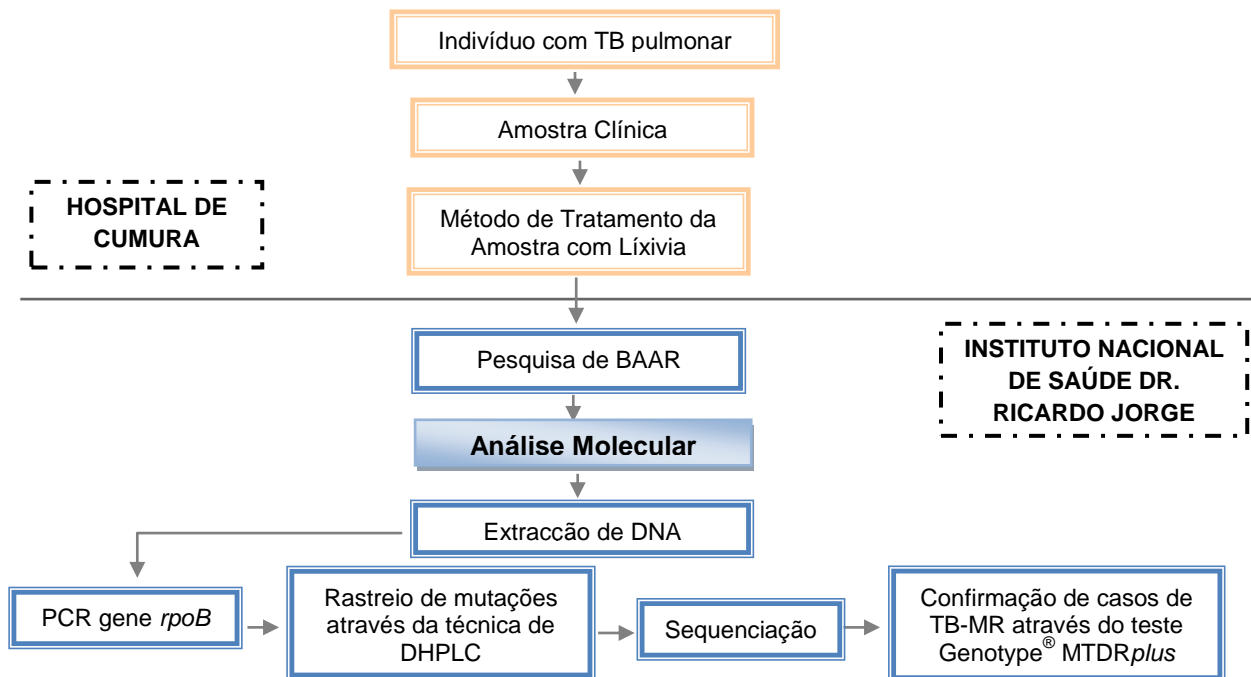
Embora os estudos moleculares estejam ainda pouco acessíveis em muitos países, é fundamental que sejam criadas parcerias com países onde o diagnóstico molecular está bem implementado. O projecto onde este trabalho estava inserido teve por base o desenvolvimento de uma parceria entre Portugal e a Guiné-Bissau. Deste modo, a população estudada consistiu num grupo de doentes com suspeita de tuberculose provenientes do Hospital de Cumura da Guiné-Bissau.

No presente estudo pretende-se:

- ▲ Estudar a resistência à rifampicina do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, através da detecção de mutações no gene *rpoB*, utilizando as técnicas moleculares de DHPLC e de Sequenciação de DNA em amostras biológicas provenientes do Hospital de Cumura.
- ▲ Avaliar o Método da Lixívia (hipoclorito de sódio (NaClO) a 5%), utilizado no processamento das amostras do Hospital de Cumura, para verificar a sua capacidade de aumentar a sensibilidade da microscopia e a sua aplicabilidade para continuação do estudo molecular.
- ▲ Optimizar e implementar a técnica de DHPLC para que possa ser usada como um método de rastreio de mutações no gene *rpoB*.
- ▲ Avaliar a existência de possíveis casos de multirresistência nas amostras proveniente do Hospital de Cumura, através de um teste comercial baseado na tecnologia DNA.Strip[®], que permite a análise da resistência simultânea à rifampicina e isoniazida.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Fluxograma de Actividades



2. População do Estudo

O Hospital de Cumura, situado a 12 km da capital Bissau, acolhe todos os doentes que, por serem extremamente pobres, não têm possibilidades para serem tratados no Hospital Central da Guiné-Bissau, sendo os serviços prestados gratuitamente. Os serviços fornecidos incluem cuidados de saúde materno-infantil a crianças e adultos com doenças graves como lepra, SIDA, tuberculose ou malária, bem como consultas externas na área da Clínica Geral, Medicina Interna e Pediatria. Apesar de se deparar com dificuldades materiais e financeiras existe hoje uma proposta para ser considerado o Hospital de Referência da Guiné-Bissau.

A participação dos indivíduos envolvidos no estudo foi autorizada através de consentimento informado e durante todo o tratamento dos dados (idade, sexo, co-infecção TB-VIH e a adesão à terapêutica) foi mantida a confidencialidade dos mesmos.

Para este trabalho foram seleccionadas um total de 96 amostras respiratórias (expectoração), colhidas entre 2009 e 2010, correspondentes a doentes do Hospital de Cumura com quadro clínico compatível com tuberculose pulmonar e com exame directo positivo (presença de bacilos álcool ácido resistentes em esfregaços corados pela Coloração de Ziehl-Neelsen).

3. Isolados Clínicos Portugueses

Na optimização das técnicas moleculares (PCR, DHPLC e sequenciação) foram utilizados 19 isolados clínicos de doentes com tuberculose, provenientes de hospitais do Norte e Centro de Portugal (obtidos entre 2001 e 2006), já caracterizados quanto à susceptibilidade aos cinco antibacilares de primeira linha (isoniazida, rifampicina, estreptomomicina, etambutol e pirazinamida).

Durante todo o estudo *M. tuberculosis* H37Rv, uma estirpe selvagem virulenta, serviu como controlo em todas as técnicas moleculares.

4. Processamento das amostras

No quadro deste estudo, o método de processamento da amostra utilizado no Hospital de Cumura foi o Método da Lixívia (“Bleach Method”) (Ängeby *et al*, 2004, Waard & Robledo, 2007). Brevemente, adicionou-se à expectoração um volume igual de lixívia com uma concentração em hipoclorito de sódio de 5%, agitou-se de modo a que este entrasse em contacto com todo o produto e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente (tal como em todos os métodos de concentração é importante respeitar o tempo de incubação). A mistura foi diluída num outro tubo, tendo-se adicionado água destilada até perfazer o volume de 50 ml. Centrifugou-se a mistura a 3000 g durante 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e guardou-se o sedimento para os estudos moleculares a ser efectuados no INSA de Lisboa.

Perante os resultados obtidos no início do estudo molecular, novas amostras (21 amostras) foram recebidas para processamento, no Hospital Amadora Sintra, utilizando o método de digestão e descontaminação com N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio (NALC-NaOH) compatível com posterior cultura (Master, 2004).

5. Pesquisa de bacilos álcool-ácido-resistentes

A pesquisa de BAAR foi realizada através da observação de esfregaços em lâminas corados pela coloração de Ziehl-Neelsen (Master, 2004). Para cada amostra (n=75) foram feitos dois esfregaços em lâmina: um antes do Método da Lixívia (no Hospital de Cumura) e outro depois do tratamento das amostras com este método (INSA). Para as 21 amostras processadas pelo Método NALC-NaOH a pesquisa de BAAR foi feita apenas em esfregaços corados após a aplicação do método. A avaliação quantitativa da baciloscopia foi realizada com base na escala recomendada pela OMS e “International Union Against Tuberculosis and Lung Disease” (IUATLD), Tabela 4.

Tabela 4 – Quantificação da baciloscopia

Bacilos observados (Métodos de coloração de Ziehl-Neelsen , ampliação 1000x)	Resultado
0	Sem BAAR*
1-9 / 100 campos	Nº exacto da contagem
10-99 /100 campos	1+
1-10 / campo	2+
> 10 / campo	3+

*observação no mínimo de 100 campos

6. Extracção e quantificação do DNA

A extracção de DNA total das amostras provenientes do Hospital de Cumura foi efectuada utilizando QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA) e seguindo o protocolo do fabricante para extracção de DNA de tecidos. Por outro lado, a extracção do DNA total dos isolados clínicos provenientes de hospitais portugueses, foi realizada pelo método de extracção com brometo de cetil trimetil amónio (CTAB), seguindo o protocolo descrito por Van Soolingen *et al* (1999).

A concentração e a pureza do DNA extraído de cada amostra foram determinadas num espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 V 3.7 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), pela leitura da absorvância a 260 nm (A_{260}) e pelo rácio das absorvâncias a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), respectivamente. A leitura a 280 nm quantifica a presença de proteínas na amostra. O rácio A_{260}/A_{280}

para DNA purificado é de 1,8, embora o rácio entre 1,7 e 2,0 seja considerado aceitável. Quando o rácio A_{260}/A_{280} é inferior a 1,7 é indicativo de contaminação por proteínas (Belisic & Sonnenberg, 1998).

7. Amplificação do gene *rpoB*

A RRDR do gene *rpoB* foi amplificada por PCR com o objectivo de se estudar posteriormente a existência de possíveis mutações, através da técnica de DHPLC e confirmação por sequenciação.

A amplificação por PCR de DNA rico em GC, tal como *M. tuberculosis* e outras micobactérias, apresenta problema uma vez que DNA rico em GC possui temperaturas de desnaturação elevadas. Com a adição de agentes desnaturantes ou co-solventes como o glicerol ou dimetil sulfoxido (DMSO), este problema pode ser ultrapassado (Varadaraj & Skinner, 1994). Embora não tenha ter sido possível adicionar à mistura de reacção de PCR um destes agentes, pois estes podem danificar a coluna onde decorre a reacção DHPLC, foi verificada a sua influência no melhoramento da amplificação por PCR.

A optimização da técnica de PCR foi conseguida através de variações na concentração final de $MgCl_2$ entre 1,5 mM e 3mM. Utilizou-se um volume final de reacção de 50 μ l, com uma composição igual à descrita na Tabela 5, à qual se adicionou 5 μ l de DNA molde.

Tabela 5 – Mistura de reacção

Reagente	Concentração Solução Stock	Volume	Concentração Solução final
H ₂ O	-	27,8 μ l	-
Tampão taq	10X	5 μ l	1X
MgCl ₂	25 mM	6 μ l	3 mM
dNTPs (BIOLINE)	10 mM	1 μ l	0,2 mM
Taq DNA polimerase (Thermo Scietific)	5 U/ μ l	0,2 μ l	1 U/reacção
“Primer” F	10 μ M	2,5 μ l	0,5 μ M
“Primer” R	10 μ M	2,5 μ l	0,5 μ M

As amplificações foram realizadas num termociclador GenAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA), sob as seguintes condições: 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C; 35 ciclos, cada um constituído por um passo de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, um passo de ligação dos “primers” à temperatura adequada (Tabela 6), durante 20 segundos e um passo de síntese a 72°C durante 1 minuto; e por último um passo de extensão final a 72°C durante 7 minutos. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por electroforese em géis de 1% de agarose (SeaKem[®] LE Agarose, Lonza, ME, USA), usando tampão TBE (Tris, ácido bórico e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)) 0,5X e com colocação de SYBR[®]Safe (Invitrogen Life Science, California, USA) ou Gel Red^{TN} (Gel Red nucleic acid gel stain, USA) no gel. As condições de corrida foram 100V durante 45 minutos e os produtos foram visualizados sob luz ultravioleta num transiluminador. O fragmento foi identificado com o auxílio do marcador de massa molecular DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche, Roche Diagnostics, Germany).

Tabela 6 – Sequências dos “primers” usados para otimizar a técnica de DHPLC.

“Primers”	Sequência do “primer”	Posição (nt)	Tamanho do produto de PCR (pb)	Temperatura de Hibridação (°C)	Referências
<i>rpoB</i> -f1 <i>rpoB</i> -r1	5’ TGGTCCGCTTGCACGAGGGTCAGA 3’ 5’ CTCAGGGGTTTCGATCGGGCACAT 3’	2098-2120 2534-2511	437	69	Van Der Zanden <i>et al</i> , 2003
<i>rpoB</i> -f2 <i>rpoB</i> -r2	5’ GCGAGCTGATCCAAAACAGAT 3’ 5’ CACGCTCACGTGACAGACCG 3’	2209-2231 2446-2466	258	58	Cooksey <i>et al</i> , 2002
<i>rpoB</i> -f1 <i>rpoB</i> -r2	5’ TGGTCCGCTTGCACGAGGGTCAGA 3’ 5’ CACGCTCACGTGACAGACCG 3’	2098-2120 2446-2466	369	63	Neste estudo

f – “forward primer”, r – “reverse primer”; pb - par de bases; nt – nucleótido

8. Técnica de DHPLC

A selecção do conjunto de “primers” (Tabela 6) a usar na técnica de DHPLC foi feita com base no programa DHPLC Melt através do site <http://insertion.stanford.edu/melt.html>, e no programa analítico WAVEmarker software (Transgenomic, Inc.), que prevê os efeitos da temperatura na estrutura helicoidal dos produtos de PCR resultantes. O algoritmo do software calcula a probabilidade de cada nucleótido da sequência permanecer na estrutura em cadeia de dupla hélice ou em cadeia simples, quando submetida a várias temperaturas na coluna (Cooksey *et al*, 2002).

A formação e detecção dos homoduplexes e heteroduplexes de DNA foi realizada na Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do INSA Dr. Ricardo Jorge.

Para a formação dos hetero e homoduplexes de DNA foram feitas misturas de 5 µl do produto de PCR de cada amostra, a ser testada, com 5 µl do produto de PCR da estirpe selvagem (*M. tuberculosis* H37Rv). Em cada corrida, foi usado como controlo negativo (ausência de mutação) 10 µl do produto de PCR da estirpe *M. tuberculosis* H37Rv, e controlo positivo uma mistura de 5 µl do produto PCR de um isolado clínico, com mutação conhecida, com 5 µl do produto de PCR da estirpe selvagem. Estas misturas foram submetidas, num termociclador, a um aquecimento de 95°C durante 3 minutos (desnaturação) e arrefecidas até aos 35°C, num decréscimo de temperatura progressivo durante 40 minutos, levando ao emparelhamento das cadeias.

A detecção dos hetero e homoduplexes formados foi realizada no aparelho Transgenomic WAVE 3500 system (Transgenomic, Nebraska, USA). Foram injectados 10µl das misturas contendo os homoduplexes e heteroduplexes de DNA na coluna DNASep Cartridge (Transgenomic, Nebraska, USA). Os ácidos nucleicos ligam-se à coluna na presença do tampão A constituído por 0,1 M de TEAA pH 7, a uma temperatura específica (66°C) que confere condições de desnaturação parcial e são eluídos na presença do tampão B constituído por 0,1 M de TEAA em 25% de ACN. A eluição dos produtos foi detectada por espectrofotometria por absorção UV a 260 nm (Cooksey *et al*, 2002). Posteriormente, procedeu-se à análise dos cromatogramas obtidos.

9. Purificação dos Produtos Amplificados

Com o intuito de eliminar o excesso de “primers”, de dNTPs e de pequenos fragmentos inespecíficos, foi realizada uma purificação dos produtos de PCR seleccionados, após realização de DHPLC. Foi utilizado, o Jet Quick – PCR Purification Kit (Genomed GmbH, Löhne, Germany), de acordo com as indicações do fabricante.

10. Sequenciação dos Produtos Purificados

Todas as sequências foram determinadas num sequenciador automático AbiPrism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na UTI do INSA Dr. Ricardo Jorge.

Os produtos purificados foram sequenciados pelo Método de Sanger com recurso ao BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems Applied Biosystems, Foster City, USA). Para cada produto efectuaram-se duas reacções de sequenciação com os “primers” utilizados na amplificação por PCR (*rpoB*-f1 e *rpoB*-r2). A mistura de reacção continha 2 µl de BigDye™, 0,25 µl de “primer” (cuja concentração inicial era de 10 µM), 4,95 µl de água ultrapura e 2,8 µl de DNA molde. As condições de amplificação foram as seguintes: um passo de desnaturação inicial a 96°C durante 3 minutos; 35 ciclos que compreendem um passo de desnaturação a 96°C durante 20 segundos, um passo de ligação do “primer” a 60°C durante 5 segundos e um passo de síntese a 60°C durante 4 minutos. Os produtos foram mantidos a 4°C até à realização da precipitação e da electroforese capilar para obtenção das respectivas sequências.

11. Análise das Sequências

A análise mutacional das sequências nucleotídicas obtidas foi realizada através do alinhamento múltiplo incluindo a sequência da estirpe *M. tuberculosis* H37Rv, usada como referência, recorrendo ao programa bioinformático BioEdit (versão 7.0.9.0). A sequência da estirpe *M. tuberculosis* H37Rv foi obtida por sequenciação e confirmada por comparação com sequências publicadas no GenBank.

12. Teste GenoType® MTBDRplus

Nas amostras cujas técnicas de DHPLC e de sequenciação de DNA revelaram existência de mutação no gene *rpoB*, fez-se a identificação molecular da amostra como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* e da resistência à rifampicina e/ou isoniazida através do Kit GenoType® MTDRplus (HAIN Lifescience, Nehren, Alemanha). A hibridação e as sucessivas lavagens foram efectuadas manualmente, usando o TWINCUBATOR® Hybridization Tray (Hain Lifesciences, Nehren, Alemanha) e seguindo o protocolo do fabricante. A interpretação do padrão das bandas obtido foi feita de acordo com as instruções do kit.

13. Tratamento Estatístico

A caracterização dos indivíduos que constituíam a amostra da população foi efectuada com base nos dados idade, sexo, co-infecção VIH-TB e adesão à terapêutica, recorrendo-se à estatística descritiva.

Para os testes estatísticos efectuados foi considerado um nível de significância de 5%.

A normalidade das variáveis, concentração e pureza de DNA e resultado da baciloscopia (inferior a 10 BAAR, 1+, 2+, 3+), foi testada através do Teste Shapiro-Wilk. Quando as distribuições não seguem uma distribuição normal, foram utilizados testes não paramétricos: Teste Kruskal-Wallis (KW) que permite comparar mais do que duas amostras independentes e o Teste de Wilcoxon (W), que permite comparar amostras emparelhadas (neste caso duas observações ao longo do tempo para o mesmo indivíduo).

O tratamento estatístico foi efectuado com o programa PASW Statistics (SPSS Statistics) versão 18.0 (SPSS Inc., Somers, New York) e com o apoio do Departamento de Epidemiologia do INSA.

IV. RESULTADOS

1. Caracterização da População em Estudo

A população em estudo correspondia a 119 indivíduos com diagnóstico presuntivo de TB, realizado na Guiné-Bissau. No entanto, foram excluídos 23 doentes devido à ausência ou quantidade insuficiente de amostra biológica. Assim, a amostra seleccionada para o estudo era composta por 96 doentes, dos quais foram recolhidos os dados relativos ao sexo, idade, assim como de co-infecção VIH-TB e adesão à terapêutica.



Figura 8 – Hospital de Cumura - fotografias do exterior (lado esquerdo) e do Laboratório (lado direito), cedidas pela Doutora Suzana David.

Sexo e Idade:

Procurou relacionar-se as variáveis idade e sexo na amostra considerada, tendo-se verificado que o maior número de casos de TB se encontrava nos indivíduos entre os 25 e 34 anos de idade, para ambos os sexos (Gráfico 1). A idade média determinada foi de 36,8 anos e a mediana de 34 anos. Não se conseguiu obter esta informação para 5 doentes.

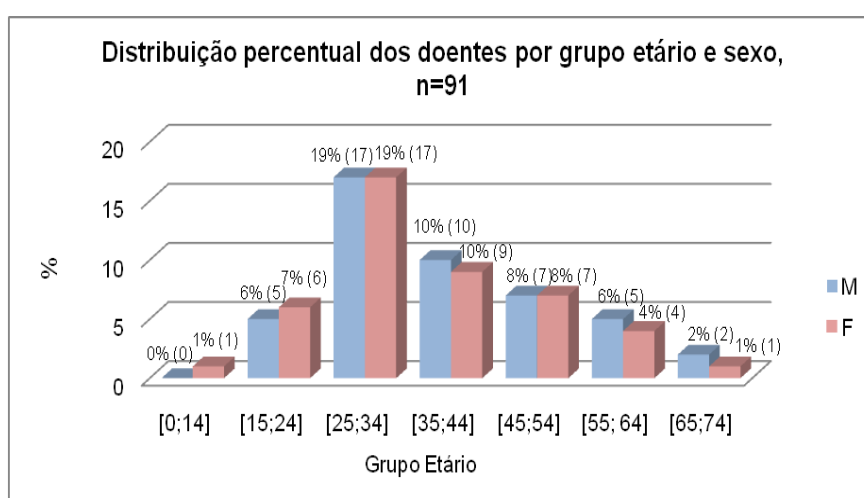


Gráfico 1 – Distribuição percentual dos 91 doentes analisados por grupo etário e género

Co-infecção TB-VIH:

Apesar de não ter sido realizado o diagnóstico da infecção VIH, no Hospital de Cumura, em 31 doentes, estudou-se a distribuição dos doentes quanto à co-infecção TB-VIH. Entre os doentes positivos para VIH, verificou-se um maior número de infecções por VIH-1 (18%) do que infecções por VIH-2 (2%), (Gráfico 2).

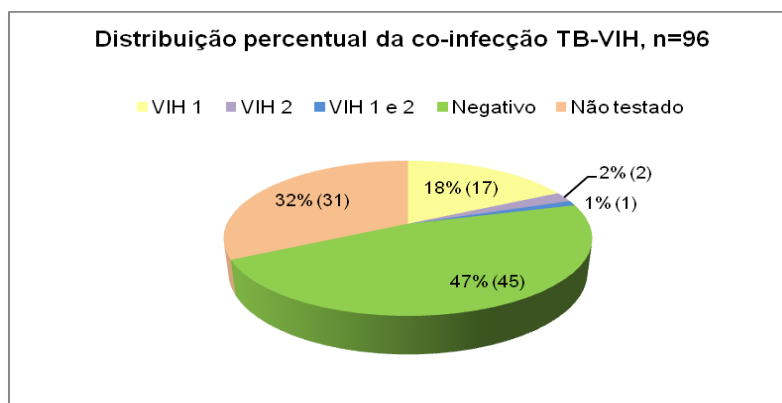


Gráfico 2 - Co-infecção TB-VIH nos 96 doentes analisados.

Adesão à terapêutica

Quanto à adesão dos doentes à terapêutica verificou-se que 48% conclui o tratamento. A taxa de abandono foi de 32% (Gráfico 3). Para 5 casos não se conseguiu obter informação.

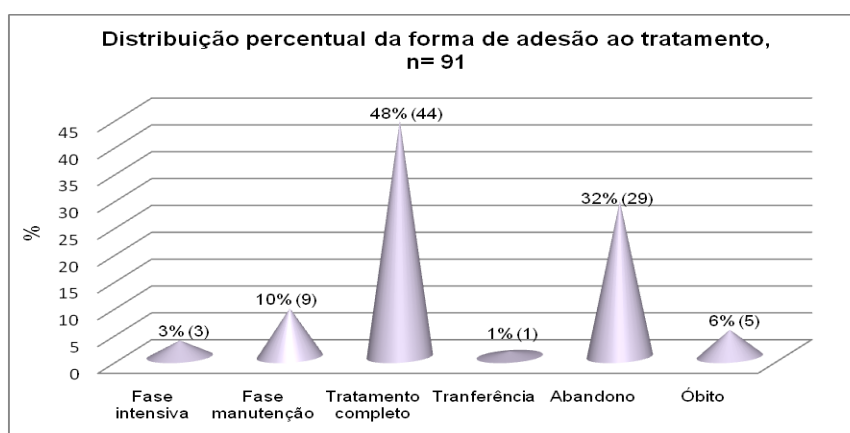


Gráfico 3 – Distribuição percentual dos 91 doentes analisados relativamente à forma de adesão à terapêutica.

2. Optimização da Técnica de PCR

A optimização da técnica de PCR foi realizada a partir de diferentes condições da mistura de reacção (A, B, C e D). Nas misturas A e B utilizou-se uma concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) de 1,5 mM, enquanto nas misturas C e D se usou uma concentração de 3 mM. Apesar de não ser possível adicionar glicerol às posteriores misturas de reacção de PCR, por este poder danificar a matriz da coluna onde decorre a reacção de DHPLC, também se testou o seu efeito na reacção de PCR. Assim, o glicerol (concentração inicial de 10%) não foi adicionado nas misturas A e C, mas sim nas misturas B e D. Para confirmar a ocorrência de amplificação, os produtos de PCR foram visualizados por electroforese em gel de agarose a 1% (p/v), tendo-se usado tampão TBE 0,5X. Apenas se obtiveram

resultados nas misturas C e D (Figura 9). Embora se tenha obtido melhor amplificação com a mistura D, foi escolhida a mistura C por não conter glicerol.

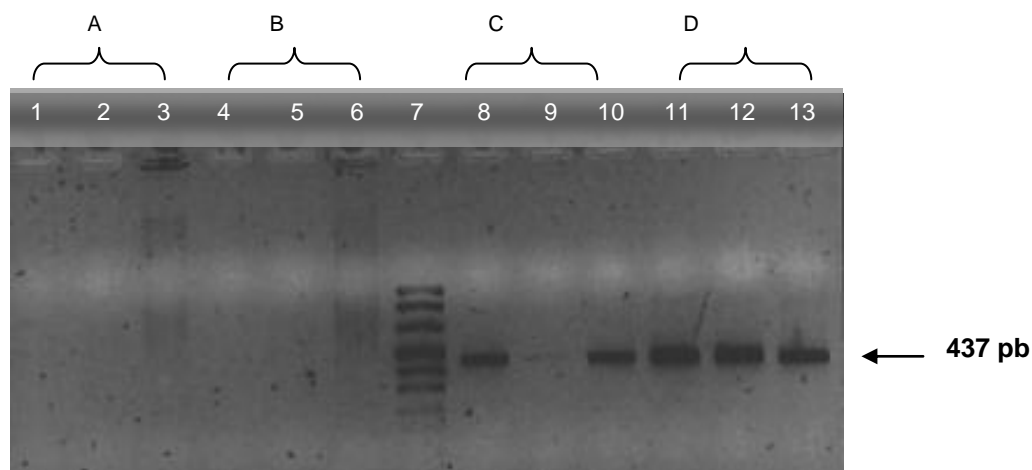


Figura 9 – Amplificação específica, por PCR, do fragmento de 437 pb do gene *rpoB*, usando diferentes condições de mistura de reacção. Imagem do gel de agarose a 1%: 1, 4, 8, 11 estirpe *M. tuberculosis* H37Rv; 2, 5, 9, 12 isolado 1P; 3, 6, 10, 13 isolado 3P; 7, DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche, Roche Diagnostics, Germany). Misturas: A, [MgCl₂] 1,5 mM, sem glicerol; B, [MgCl₂] 1,5 mM, com glicerol (10%); C, [MgCl₂] 3 mM, sem glicerol; D, [MgCl₂] 3 mM, com glicerol (10%).

3. Avaliação da aplicabilidade do Método da Lixívia

Neste trabalho pretendeu-se avaliar o método da Lixívia quanto à sua eficácia no melhoramento do resultado da microscopia e quanto à sua aplicabilidade para continuação do estudo molecular.

3.1 Sensibilidade da microscopia

A eficácia no melhoramento do resultado da microscopia do Método da Lixívia, com etapa de concentração da amostra, foi analisada através da observação de lâminas coradas pela coloração Ziehl-Neelsen, antes e depois da aplicação deste método. Os esfregaços em lâmina antes da aplicação do Método da Lixívia foram realizados no Laboratório do Hospital de Cumura, não havendo lâminas disponíveis para 10 amostras. Deste modo, a análise estatística foi efectuada com base nos resultados da baciloscopia obtidos antes e depois da aplicação do Método da Lixívia para 65 amostras. No tratamento estatístico, os resultados da baciloscopia foram tratados como variáveis ordinais e depois de aplicado o Teste de Wilcoxon, verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas ($p=0,001$) antes e depois do processamento da amostra. Assim, este método permite melhorar a sensibilidade da microscopia, uma vez que se observou uma maior quantidade de BAAR depois da aplicação do método (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultado das observações das lâminas ao microscópio

Quantificação da baciloscopia	Método da Lixívia		Método NALC-NaOH
	Exame directo*	Depois do processamento	Depois do processamento
Negativo	10	2	0
2 BAAR	0	1	1
3 BAAR	1	1	1
5 BAAR	2	0	2
7 BAAR	1	0	0
8 BAAR	2	0	0
1+	14	21	7
2+	18	13	5
3+	17	37	5
Total de Lâminas	65	75	21

*Antes do processamento da amostra com o método da Lixívia

Da observação ao microscópio dos esfregaços em lâmina (n=96) realizados após a aplicação dos métodos de processamento (Lixívia ou NALC-NaOH), verificou-se que 2 amostras apresentavam baciloscopia negativa, tendo-se realizado posteriormente o estudo molecular nas restantes 94 amostras com baciloscopia positiva (Tabela 7).

3.2 Compatibilidade do Método da Lixívia com o diagnóstico molecular

A possibilidade de usar amostras tratadas pelo Método da Lixívia em diagnóstico molecular foi avaliada tendo como indicadores quantidade e pureza de DNA obtidos, após extracção pelo QIAamp® DNA Mini Kit, e por confirmação de amplificação por PCR do gene *rpoB* no DNA extraído.

Aplicou-se o Teste Kruskal-Wallis para se verificar a existência de associação entre as variáveis quantidade de DNA obtido e resultado de baciloscopia ($p=0,252$) assim como entre as variáveis pureza do DNA e resultado de baciloscopia ($p=0,508$). Nos dois casos não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas, (Tabela 8).

Relativamente à confirmação de amplificação do fragmento do gene *rpoB*, obteve-se sucesso de amplificação para as 94 amostras com baciloscopia positiva (Figura 10)

Tabela 8 – Concentração e pureza de DNA extraído. Os valores representam a média \pm desvio padrão para cada resultado de baciloscopia (n=75) e “p-value”

	<10 BAAR	1+	2+	3+	“p-value”*
[DNA]	2,15 \pm 0,66	20,45 \pm 42,84	65,00 \pm 110,33	76,52 \pm 225,52	0,252
Pureza	1,50 \pm 0,58	1,80 \pm 0,42	1,69 \pm 0,19	1,68 \pm 0,29	0,508

[DNA] concentração de DNA em ng/ μ l; <10 BAAR significa 1 a 9 bacilos por 100 campos; 1+ significa 10 a 99 bacilos por campos; 2+ significa 1 a 10 bacilos por campo; 3+ significa mais de 10 bacilos por campo

* $p=0,05$ para o teste Kruskal-Wallis

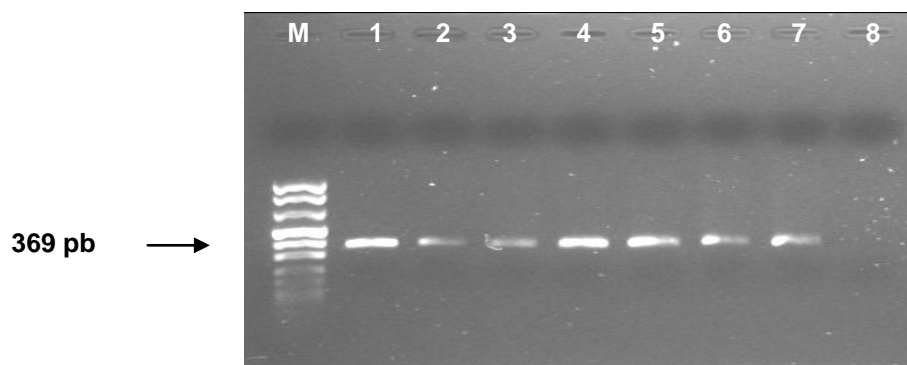


Figura 10 – Amplificação específica, por PCR, do fragmento do gene *rpoB* com 369 pb de amostras tratadas com lixívia. Imagem do gel de agarose a 1%: M, DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche, Roche Diagnostics, Germany). 1, estirpe selvagem *M. tuberculosis* H37Rv; 2 a 7 amostras do Hospital de Cumura; 8, controlo negativo.

4. Detecção de mutações no gene *rpoB* por DHPLC

4.1 Optimização

A técnica de DHPLC permitiu verificar a presença ou ausência de possíveis mutações na região RRDR do gene *rpoB*. A optimização desta técnica foi realizada com recurso ao DNA extraído de isolados clínicos provenientes de hospitais do Norte e Centro de Portugal, dos quais se tinha a informação sobre a resistência aos antibacilares, nomeadamente à rifampicina. O produto de PCR de cada amostra foi misturado com o produto de PCR da estirpe selvagem *M. tuberculosis* H37Rv, de modo permitir a formação dos homoduplexes e dos heteroduplexes, após desnaturação e novo emparelhamento. Os fragmentos foram posteriormente analisados por DHPLC.

Os parâmetros a otimizar foram: tamanho do fragmento, temperatura de desnaturação e percentagem do tampão de eluição.

Tamanho do fragmento

Neste trabalho foram testados três conjuntos de “primers” rpoB-f1/rpoB-r1, rpoB-f2/rpoB-r2 e rpoB-f1/rpoB-r2 que amplificam os fragmentos 437 pb, 258 pb e 369 pb, respectivamente. Embora os três fragmentos apresentem um tamanho que está compreendido entre os 150 e 700 pb, os melhores resultados foram obtidos com o fragmento de 369 pb. Neste fragmento, a zona RRDR (81pb) encontra-se entre as posições 260 pb e 341 pb, Gráfico 4.

Temperatura óptima da coluna

A temperatura óptima da coluna corresponde a uma fracção de desnaturação do DNA entre os 0,75 e os 1,00. Para determinar, teoricamente, a temperatura óptima de análise utilizou-se o programa analítico WAVEmarker Software (Transgenomic, Inc.) e o programa DHPLC Melt disponível no site <http://insertion.stanford.edu/melt.html>.

O programa analítico WAVEmarker Software (Transgenomic, Inc.) permitiu obter o Gráfico 6, verificando-se que 65°C seria a temperatura óptima (linha vermelha) de análise, uma vez que o DNA se encontra parcialmente desnaturado na zona de interesse (81pb) a esta temperatura. Segundo o programa DHPLC Melt a temperatura recomendada foi de 64°C. No entanto, quando se testaram as

várias temperaturas constatou-se, empiricamente, que a temperatura de 66°C conferia melhores resultados, ou seja, uma melhor distinção entre os homoduplexes e os heteroduplexes. Assim, a temperatura de 66°C foi a escolhida para posteriores análises por DHPLC. Os cromatogramas obtidos para cada temperatura de desnaturação estão representados no Anexo 1.

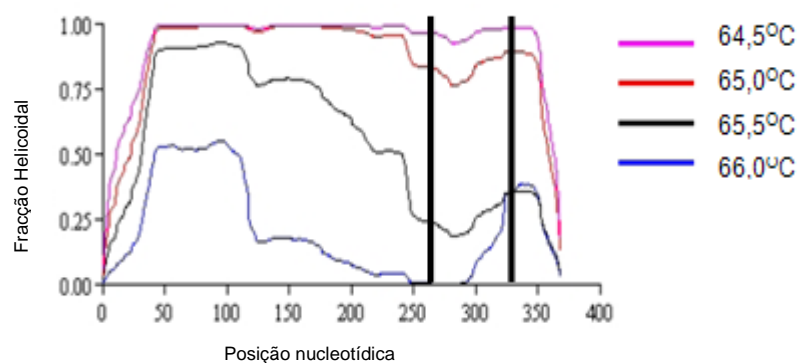


Gráfico 4 – Perfis de desnaturação para várias temperaturas. As linhas verticais delimitam a região dos 81 pb onde se localizam a maioria das mutações responsáveis pela resistência à rifampicina.

Percentagem do tampão de eluição (tampão B)

A percentagem do tampão B (%B) tem influência no tempo de retenção dos heteroduplexes e dos homoduplexes de DNA na matriz da coluna, por conseguinte um aumento na sua percentagem reflecte uma diminuição no tempo de retenção, e vice-versa.

Uma corrida tem a duração total de 8 minutos, sendo que o pico de injeção deve ser detectado entre 1 e 2,30 minutos e o de lavagem por volta dos 7 minutos. Deste modo, o ideal será obter-se o pico da amostra entre os 4 e 6 minutos. Teoricamente, segundo o “software” do equipamento, a %B ideal seria de 56%. No entanto, quando se usou esta %B verificou-se que os picos dos heteroduplexes e homoduplexes de DNA eram detectados entre os 6 e os 7 minutos, quase que se sobrepondo com ao pico de lavagem, correndo-se o risco do pico da amostra não ser detectado. Para antecipar a detecção do pico da amostra, está descrito que se deve alterar a %B em 1% para cada meio minuto. Assim, quando se aumentou a percentagem de 56% para 58%, conseguiu-se uma diminuição no tempo de retenção, visualizando-se os picos entre os 5 e os 6 minutos e evitando haver sobreposição com o pico de injeção ou com pico de lavagem.

4.2 Detecção de Mutações nos Isolados Clínicos Portugueses

No conjunto dos isolados clínicos 14 isolados eram resistentes e 5 susceptíveis à rifampicina. Após extracção do DNA dos isolados clínicos e amplificação do fragmento de 369pb do gene *rpoB* por PCR, procedeu-se ao rastreio de mutações pela técnica de DHPLC. Obtiveram-se quatro perfis de DHPLC bem distintos (Figura 11). Um perfil correspondente aos homoduplexes, que apresentam um só pico no cromatograma, indicando ausência de mutação e três perfis para os heteroduplexes, que revelam dois ou três picos no cromatograma, consoante o tipo de mutação.

Os 5 isolados clínicos susceptíveis à rifampicina apresentaram um perfil característico de homoduplexe e os 14 isolados resistentes tinham um perfil de heteroduplexes. Deste modo, verificou-se uma sensibilidade (proporção de isolados resistentes na amostra testada identificados pelo DHPLC

como heteroduplexes) e especificidade (proporção de isolados susceptíveis na amostra testada identificados pelo DHPLC como homoduplexes) de 100% (Tabela 9).

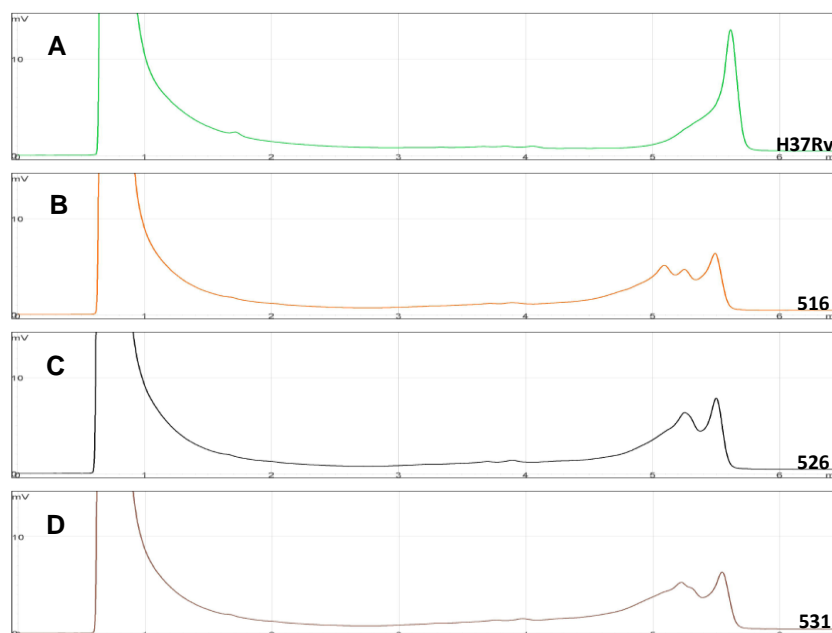


Figura 11 – Cromatogramas de DHPLC de isolados clínicos portugueses com mutações no fragmento de 369 pb do gene *rpoB*. A: formação de homoduplexes da estirpe selvagem, B a D: formação de heteroduplexes com mutações nos códons D516V (B), H526Y (C) e S531L (D).

Condições: coluna DNASep® Cartridge (Transgenomic, Nebraska, USA), tampão A (TEAA a 0,1 M), pH 7; tampão B (TEAA a 0,1 M e 25% de acetonitrilo), pH 7; rácio 58% B; temperatura da coluna 66°C; detecção UV 260 nm.

Tabela 9 – Comparação dos resultados do teste de susceptibilidade aos antibióticos (TSA), nomeadamente à rifampicina, com os resultados obtidos por DHPLC

		TSA	
		Resistente	Susceptível
DHPLC	Heteroduplexe	14	0
	Homoduplexe	0	5

4.3 Detecção de Mutações nas Amostras do Hospital de Cumura

O procedimento realizado para as amostras provenientes do Hospital de Cumura foi igual ao dos isolados clínicos portugueses. Os resultados obtidos revelaram dois perfis diferentes para os heteroduplexes, indicativo da existência de duas mutações diferentes (Figura 12). As frequências obtidas para os homoduplexes e heteroduplexes de DNA estão representadas na Tabela 10.

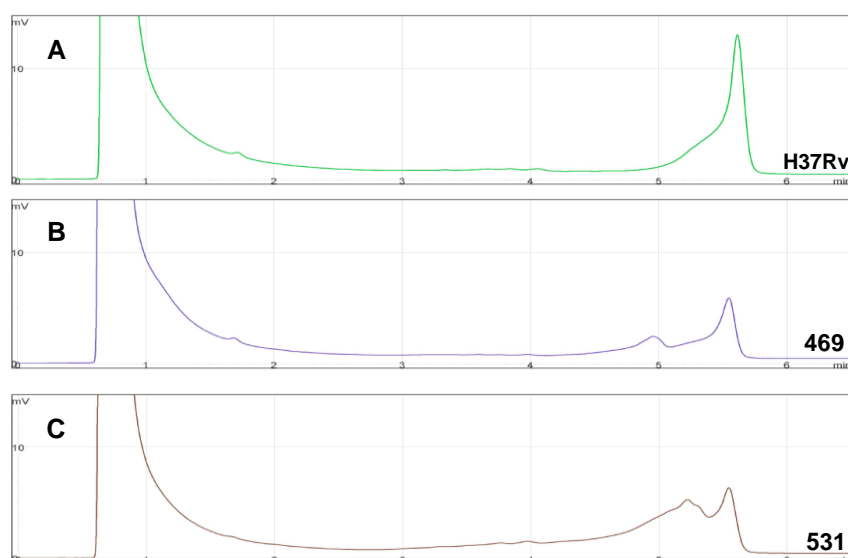


Figura 12 – Cromatogramas de DHPLC das amostras do Hospital de Cumura com mutações no fragmento (369 pb) do gene *rpoB*. A: formação de homoduplexes da estirpe selvagem, B e C: formação de heteroduplexes com mutações nos codões S469L (B), S531L (C).

Condições: coluna DNASep[®] Cartridge (Transgenomic, Nebraska, USA), tampão A (TEAA a 0,1 M), pH 7; tampão B (TEAA a 0,1 M e 25% de acetonitrilo), pH 7; rácio 58% B; temperatura da coluna 66°C; detecção UV 260 nm.

Tabela 10 – Resultados obtidos pela técnica de DHPLC para as amostras do Hospital de Cumura

Perfil de DHPLC	Nº de amostras (%)
Homoduplexe	64 (68%)
Heteroduplexe	30 (32%)
Total	94 (100%)

5. Confirmação das Mutações por Sequenciação

A confirmação da existência de mutações foi conseguida por sequenciação e alinhamento das sequências obtidas com a sequência homóloga da estirpe *M. tuberculosis* H37Rv (estirpe selvagem virulenta), também obtida por sequenciação.

5.1 Isolados Clínicos Portugueses

As Figuras 13 e 14 representam as alterações nucleotídicas detectadas e o alinhamento das sequências obtido pelo programa BioEdit, respectivamente. No conjunto das mutações encontradas a mais frequente foi a mutação S531L (alteração no codão 531 de Serina para Leucina) estando presente em 12 isolados (63,1%). A mutação A516V foi detectada num isolado (5,3%) e a mutação H526T também num isolado (5,3%) (Tabela 11).

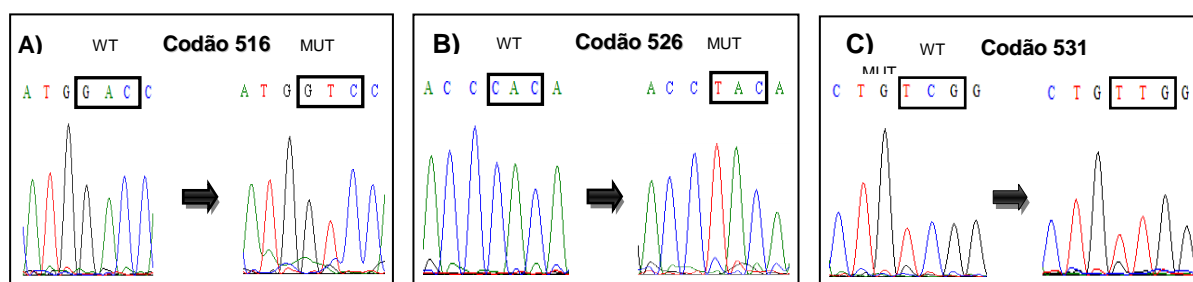


Figura 13 – Detecção da mutação no fragmento de 369 pb do gene *rpoB*, por comparação da sequência na estirpe selvagem *M. tuberculosis* H37Rv (WT) e mutante resistentes (MUT): (A) alteração no codão 516 (B) alteração no codão 526 (C) alteração no codão 531

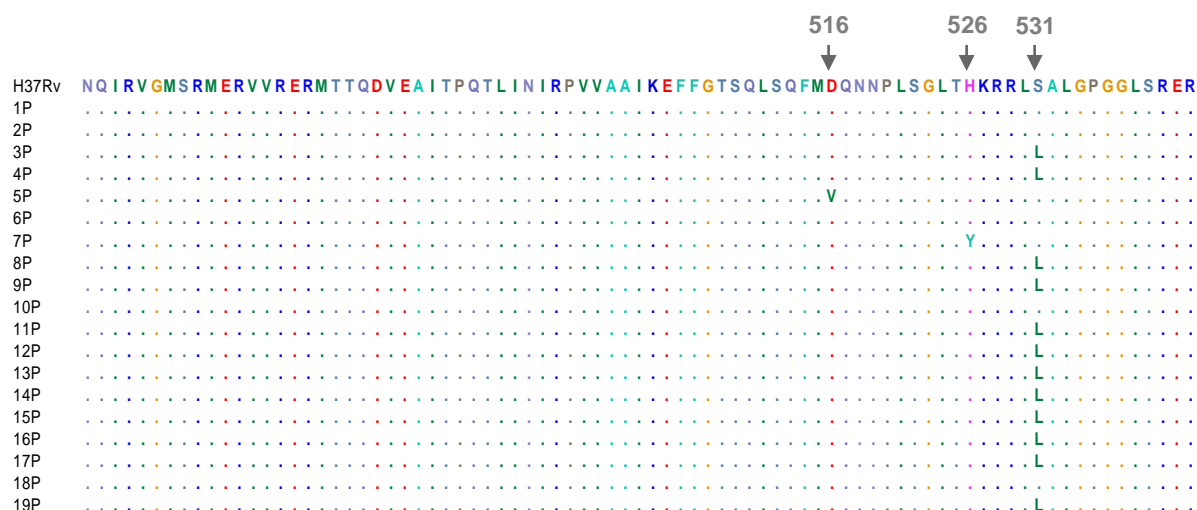


Figura 14 – Alinhamentos obtidos pelo programa BioEdit das sequências de aminoácidos do fragmento de 369pb do gene *rpoB* da estirpe selvagem *M. tuberculosis* H37Rv dos isolados sensíveis e resistentes à rifampicina. A alteração aminoacídica e o respectivo codão estão indicados com uma seta. D – Ácido Aspártico (Asp); V - Valina (Val); H – Histidina (His); Y – Tirosina (Tir); S – Serina (Ser); L – Leucina (Leu).

Tabela 11 – Mutações encontradas no gene *rpoB* dos 19 isolados clínicos portugueses

Mutações		Nº isolados (%)
Nucleotídica	Aminoacídica	
A2386T	A516V	1 (5,3%)
C2415T	H526T	1 (5,3%)
C2431T	S531L	12 (63,1%)
Sem Mutações		5 (26,3%)
Total		19 (100%)

5.2 Amostras do Hospital de Cumura

No conjunto das 94 amostras provenientes do Hospital de Cumura foram encontradas duas mutações diferentes, cujas alterações nucleotídicas detectadas e o alinhamento das sequências obtido pelo programa BioEdit estão representadas nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Entre as mutações encontradas a mais frequente foi a mutação S469L estando presente em 27 amostras (28,7%). A mutação S469L não tinha sido ainda descrita, pelo que poderá estar ou não associada à resistência à rifampicina. A outra mutação detectada foi a mutação S531L que estava presente em 3 estirpes (3,2%) (Tabela 12).

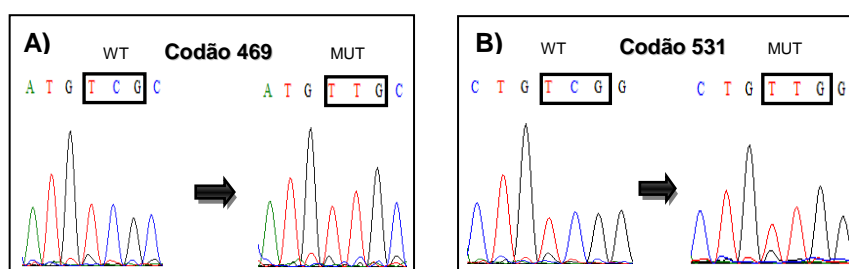


Figura 15 – Detecção da mutação no fragmento de 369 pb do gene *rpoB*, por comparação da sequência na estirpe selvagem *M. tuberculosis* H37Rv (WT) e amostra onde foi detectada mutação (MUT): (A) alteração no codão 469 (B) alteração no codão 531.

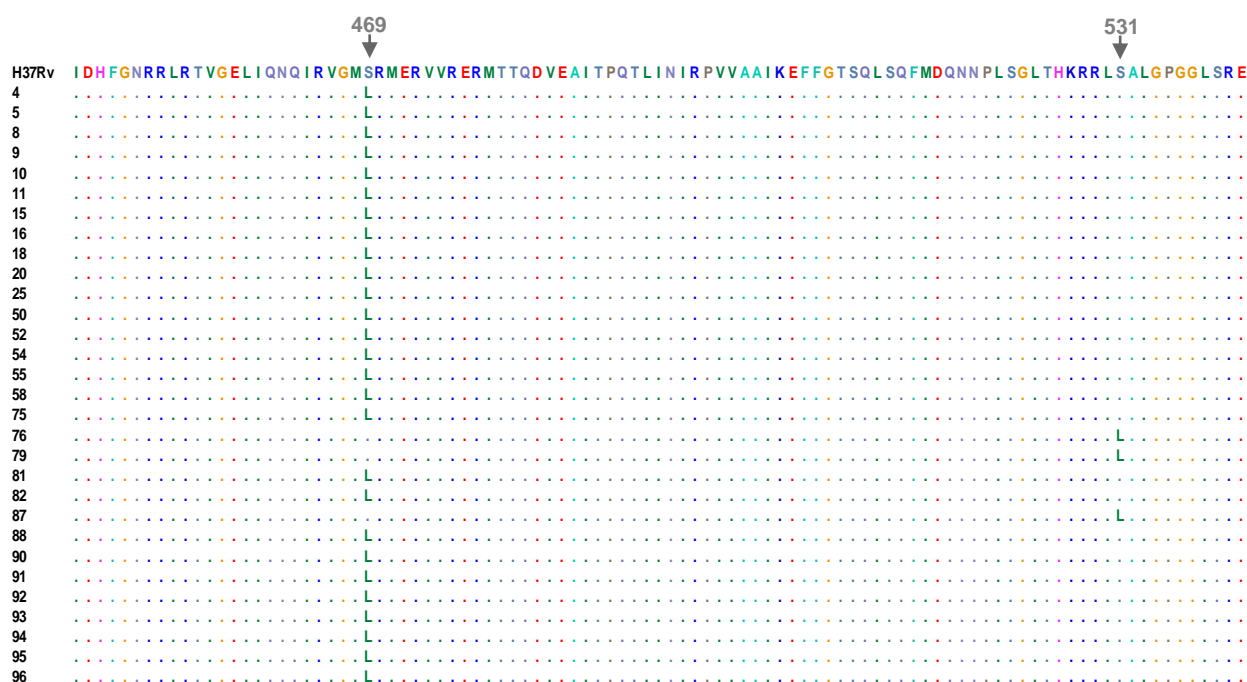


Figura 16 – Alinhamentos obtidos pelo programa BioEdit das sequências de aminoácidos do fragmento de 369pb do gene *rpoB* da estirpe selvagem *M. tuberculosis* H37Rv com as amostras onde foi detectada mutação (4, 5, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 18, 20, 25, 50, 52, 54, 55, 58, 75, 76, 79, 81, 82, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96). A alteração aminoacídica e o respectivo codão estão indicados com uma seta. S – Serina (Ser); L – Leucina (Leu).

Tabela 12 – Mutações encontradas no gene *rpoB* de 94 amostras do Hospital de Cumura

Mutações		Nº amostras (%)
Nucleotídica	Aminoacídica	
C2245T	S469L	27 (28,7%)
C2431T	S531L	3 (3,2%)
Sem Mutação (DHPLC)		64 (68,1%)
Total		94 (100%)

6. Mutação S469L

Pesquisou-se a presença da mutação S469L em outras estirpes de *M. tuberculosis* usando o genômico BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) no NCBI (“National Center for Biotechnology Information” - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) Pela observação dos resultados da

pesquisa constatou-se que nenhuma estirpe do complexo *M. tuberculosis* apresentava alteração no codão 469, com exceção da estirpe *M. tuberculosis* K85 (Figura 17).

Para analisar o fragmento de 369 pb do gene *rpoB*, amplificado por PCR, procedeu-se ao alinhamento de sequências deste gene de várias estirpes de referência de micobactérias, algumas do complexo *M. tuberculosis*, e bactérias pertencentes a gêneros aparentados, que se encontram na base de dados GenBank. O alinhamento no programa BioEdit permitiu não só averiguar a especificidade do conjunto de “primers” usado, como também verificar a presença da alteração aminoácídica da estirpe *M. tuberculosis* K85, (Figura 18).

```

H37Rv      1      TGGTCCGCTTGCACGAGGGTCAGACCACGATGACCGTTCGGGGCGGCGTCGAGGTGCCGG
K85        1      TGGTCCGCTTGCACGAGGGTCAGACCACGATGACCGTTCGGGGCGGCGTCGAGGTGCCGG

H37Rv     61      TGGAAACCGACGACATCGACCACTTCGGCAACCGCCGCTCGGTACGGTCGGCGAGCTGA
K85        61      TGGAAACCGACGACATCGACCACTTCGGCAACCGCCGCTCGGTACGGTCGGCGAGCTGA

H37Rv      1      TCCAAAACAGATCCGGGTCGGCATGTTCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCGGATGA
K85        1      TCCAAAACAGATCCGGGTCGGCATGTTCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCGGATGA

H37Rv     181     CCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTGC
K85        181     CCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTGC

H37Rv     241     CCGCGATCAAGGAGTTCCTTCGGCACCAGCCGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACACC
K85        241     CCGCGATCAAGGAGTTCCTTCGGCACCAGCCGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACACC

H37Rv     301     CGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCCGCGACTGTCGGGCTGGGGCCCGGGTCTGTAC
K85        301     CGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCCGCGACTGTCGGGCTGGGGCCCGGGTCTGTAC

H37Rv     361     GTGAGCGTG 369
K85        361     GTGAGCGTG

```

Figura 17 – Fragmento de 369 pb do gene *rpoB*. Comparação entre as estirpes *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* K85 com a mutação C2245T (marcada a laranja).

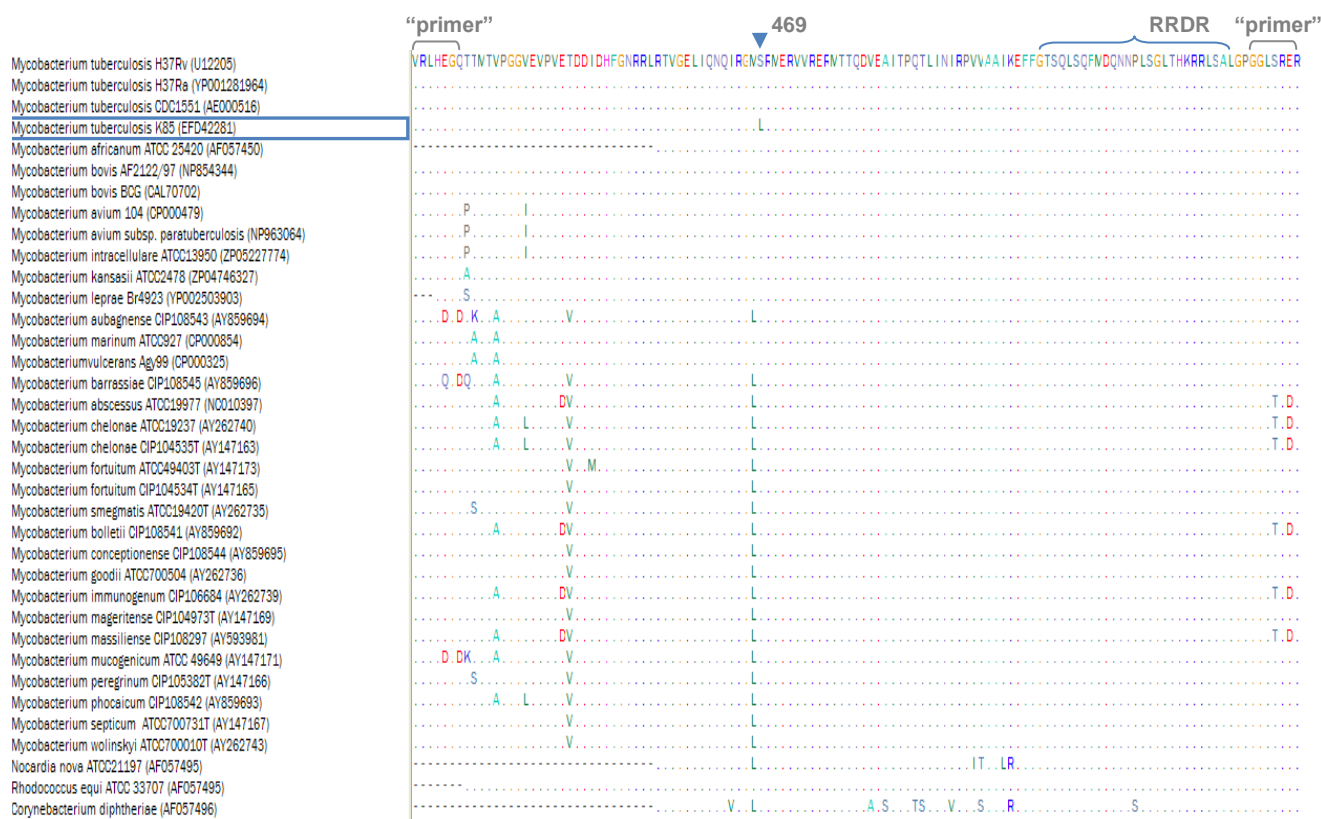


Figura 18 – Alinhamento da sequência de aminoácidos do fragmento (369 pb) do gene *rpoB* de várias estirpes de referência. As sequências encontram-se na base de dados GenBank. Os aminoácidos comuns aos vários microrganismos estão indicados por pontos e a ausência de aminoácido está indicada por traços. O aminoácido na posição 469 está representado por uma seta e região RRDR e os “primers” estão indicados por chavetas.

7. Pesquisa de Tuberculose Multirresistente

O método molecular GenoType® MTBDR $plus$ permite fazer o diagnóstico rápido à amostra e detecta as mutações mais comuns nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA*.

Com o objectivo de avaliar possíveis casos de multirresistência nas amostras do Hospital de Cumura que evidenciaram a mutação S531L, realizou-se o teste GenoType® MTDR $plus$. Das três amostras onde foi detectada a mutação S531L, uma apresentou mutação S315T (alteração nucleotídica AGC para ACC) no gene *katG*, sendo o único caso de multirresistência nas amostras da Guiné-Bissau. As outras duas amostras onde se detectou a mutação S531L são casos de monorresistentes à rifampicina (Figura 19).

A mutação S469L por estar fora da região dos 81 pb não é detectada por este método. No entanto, do conjunto das 27 amostras, onde foi detectada esta mutação, 14 foram testadas com este método de forma a caracterizar a resistência à isoniazida. Os resultados obtidos não evidenciaram resistência à isoniazida (Tabela 13). Deste modo, não é possível para já afirmar que são casos de monorresistência, pois é desconhecida a implicação da mutação S469L na resistência à rifampicina.

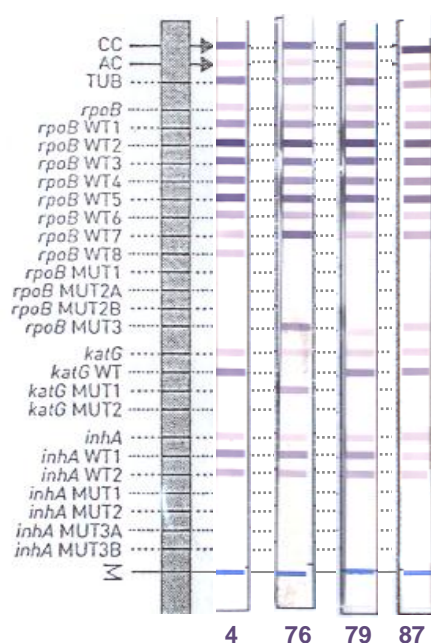


Figura 19 – Exemplo dos resultados expectáveis de uma análise genotípica pelo Kit GenoType® MTDR $plus$. O mutante 4 continha mutação S469L e os mutantes 76, 79 e 87 continham mutação S531L no gene *rpoB*.

Tabela 13 – Síntese dos resultados obtidos nas amostras com mutações no gene *rpoB*

Código	BAAR	<i>rpoB</i> (369pb)	DHPLC	Sequenciação (codão mutado)	Genotype [®] MTDRplus			
					TUB*	RIF <i>rpoB</i>	INH <i>katG inhA</i>	
4	3+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
5	1+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
8	3+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
9	3+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
10	2+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
11	3+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
15	3+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
16	3+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
18	3+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
20	3+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
25	1+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
50	2+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
52	3+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
54	3+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
55	3+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
58	1+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
75	3+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
76	3+	P	Heteroduplexe	531	P	MUT3	MUT1	WT
79	1+	P	Heteroduplexe	531	P	MUT3	WT	WT
81	1+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
82	1+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
87	1+	P	Heteroduplexe	531	P	MUT3	WT	WT
88	2+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
90	3+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
91	1+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
92	1+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
93	3+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
94	5 BAAR	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-
95	3+	P	Heteroduplexe	469	P	WT	WT	WT
96	2+	P	Heteroduplexe	469	-	-	-	-

* Marcador do complexo *Mycobacterium tuberculosis*;

P – Positivo; WT – ausência de mutação; Traço (-) técnica não aplicada

V. DISCUSSÃO

O objectivo principal deste trabalho consistiu na detecção molecular de mutações que conferem resistência à rifampicina, em amostras respiratórias de doentes com diagnóstico presuntivo de tuberculose pulmonar, provenientes do Hospital de Cumura da Guiné-Bissau. Neste Hospital não existem as condições laboratoriais requeridas para se efectuar isolamento do agente etiológico em meios de cultura (considerado o “gold standard” no diagnóstico laboratorial da tuberculose) e análises moleculares. Deste modo, o diagnóstico de doença activa, tal como noutros países em desenvolvimento onde a tuberculose é o maior problema de saúde pública, é feito principalmente com base no historial do doente, no quadro clínico e no exame directo positivo, detectando a presença de bacilos álcool-ácido-resistentes (Ritacco *et al*, 2007).

Do conjunto dos 119 doentes, foram excluídos do estudo 23 indivíduos devido à ausência ou quantidade insuficiente de amostra biológica destes doentes. Para os 96 indivíduos seleccionados fez-se uma análise dos dados idade, sexo, co-infecção VIH-TB e adesão à terapêutica. Verificou-se que o maior número de casos de tuberculose se encontrava nos indivíduos entre os 25 e 34 anos de idade, tanto para o sexo feminino como masculino, sendo a idade média e mediana, respectivamente, 36,8 e 34 anos.

A infecção VIH constitui o maior factor de risco de aparecimento da tuberculose activa, facto explicado pela imunodepressão provocada pelo vírus e pela importância da imunidade no controlo da tuberculose (DGS, 2009). A associação das duas doenças continua hoje em dia a ser um dos principais problemas de saúde pública. Sabe-se que o VIH-1 é responsável pela pandemia a nível mundial e o VIH-2 é responsável por epidemias localizadas em regiões de África Ocidental e um número reduzido de casos na Europa e noutros continentes com ligações epidemiológicas a estas regiões (Azevedo-Pereira, 2008). A Guiné-Bissau foi considerada, na década de 80 e 90, o país endémico no que respeita à infecção por VIH-2, porém a situação neste país tem vindo a inverter-se com o aumento acentuado de casos VIH-1 e conseqüente declínio dos casos VIH-2 (Andersson *et al*, 1999). No estudo de Zacarias *et al* (2008), realizado entre 1996 e 2006 também verificou um aumento da prevalência do VIH-1 e uma diminuição da prevalência do VIH-2 na Guiné-Bissau, sendo que a infecção por VIH-2 continua a afectar os grupos etários mais velhos, sobretudo mulheres (Zacarias *et al*, 2008). Esta situação está de acordo com o que se verificou no presente trabalho, uma vez que observou-se um maior número de infecções por VIH-1 (18%) do que por VIH-2 (2% doentes), havendo um caso de co-infecção pelos dois vírus (1%).

O resultado do tratamento da tuberculose pode ser avaliado segundo os seguintes critérios: cura comprovada (o doente ao completar o tratamento apresenta duas baciloscopias negativas); cura não comprovada (o doente ao completar o tratamento não realiza as baciloscopias); falência do tratamento; abandono; transferência e óbito. O sucesso do tratamento pode ser determinado através da soma dos casos que tiveram cura comprovada e cura não comprovada. O insucesso compreende os casos de abandono, falência do tratamento e óbito (Albuquerque *et al*, 2001).

Relativamente à adesão ao tratamento dos doentes do Hospital de Cumura verificou-se que 48% conclui o tratamento com antibacilares. No entanto, a carência de informação sobre cura comprovada

ou não comprovada não permitiu avaliar a taxa de sucesso do tratamento. Por outro lado, foi possível determinar uma taxa de insucesso do tratamento de 38%, sendo a percentagem de abandono de 32% e de óbito 6%. Uma taxa de abandono tão elevada é preocupante, não só por causar danos individuais, como também por pôr em risco a saúde pública. O abandono pode levar a um prolongamento da infecciosidade, aumentando a probabilidade de transmissão da doença, assim como propiciar a aquisição de resistências aos antibióticos (CDC, 2007; WHO, 2008).

O exame directo (baciloscopia) é uma ferramenta fundamental no diagnóstico de tuberculose, embora apresente uma baixa sensibilidade (Apers *et al*, 2004). Nos programas DOTS, a microscopia continua a ser a técnica recomendada para o diagnóstico de tuberculose, assim como para a monitorização do tratamento (CDC, 2003).

Alguns testes de diagnóstico mais sensíveis têm sido desenvolvidos. No entanto, poucos poderão substituir a microscopia e serão acessíveis a países cujos laboratórios têm condições precárias (Guillerm *et al*, 2006). O exame directo tem como vantagens ser simples e barato, no entanto não permite diferenciar entre bacilos viáveis e não viáveis, nem permite diferenciar espécies de micobactérias (CDC, 2003).

Vários artigos mostraram a importância de otimizar as técnicas de microscopia no diagnóstico da tuberculose com o intuito de melhorar a sua sensibilidade, podendo trazer benefícios não só para os doentes como para os serviços de cuidados de saúde. (Steingart *et al*, 2006; Keeler *et al*, 2006; Mase *et al*, 2007; Steingart *et al*, 2007).

No quadro deste estudo, o método de processamento da amostra utilizado no Hospital de Cumura foi o Método da Lixívia com etapa de concentração. A capacidade deste método no melhoramento da sensibilidade da microscopia e a sua aplicabilidade foram avaliadas neste trabalho.

A avaliação da sensibilidade foi efectuada com base na baciloscopia de 65 amostras, para as quais existiam duas lâminas (efectuadas antes e depois do processamento da amostra).

A análise estatística dos resultados da baciloscopia, revelou que existiam diferenças estatisticamente significativas (Teste Wilcoxon; $p=0,001$) antes e depois da aplicação do método, está de acordo com a maior quantidade de BAAR observada após a aplicação do método.

Deste modo, o Método da Lixívia com a etapa de concentração permite aumentar a sensibilidade da microscopia e com isto proporcionar um melhor resultado no diagnóstico. Um estudo realizado por Bonett *et al* (2007) já havia demonstrado que o Método da Lixívia com concentração por sedimentação melhorou os resultados da microscopia para o diagnóstico de tuberculose num contexto de elevada prevalência de VIH (Bonett *et al*, 2007). Segundo, Ängeby *et al* (2004) existe evidência suficiente para recomendar a avaliação e a introdução do Método da Lixívia na maioria dos contextos onde a cultura de micobactérias não é realizada rotineiramente (Ängeby *et al*, 2004).

Após a quantificação da baciloscopia, nas 96 amostras processadas com lixívia ou NALC-NaOH, duas apresentaram baciloscopia negativa, tendo o estudo molecular abrangido 94 amostras com baciloscopia positiva.

A possibilidade de usar amostras tratadas pelo Método da Lixívia em diagnóstico molecular foi avaliada tendo como indicadores quantidade e pureza de DNA obtidos, após extração, e por confirmação de amplificação por PCR do gene *rpoB* no DNA extraído.

A análise estatística revelou a não associação entre as variáveis quantidade de DNA obtido e resultado de baciloscopia ($p=0,252$) assim como entre as variáveis pureza do DNA e resultado de baciloscopia ($p=0,508$). Esta análise leva a entender, neste caso, que a quantidade de bacilos não influencia a concentração e pureza de DNA obtido após extração.

Relativamente à confirmação de amplificação do fragmento do gene *rpoB*, obteve-se sucesso de amplificação para todas amostras com baciloscopia positiva.

Embora o Método da Lixívia não permita a posterior cultura, este não impede a realização de estudos moleculares.

Até à data não foi descrito qualquer método de aquisição de resistência através de transferência horizontal de genes em *M. tuberculosis*. Assim, o único processo conhecido é através de mutações em genes associados à resistência. Em *M. tuberculosis* não existem mutações individuais capazes de conferir resistência a mais do que um antibacilar, sendo necessária a ocorrência de várias mutações sucessivas em genes associados à resistência. Deste modo, estudos desta natureza podem ser realizados direccionando a procura de mutações em genes chave que possam estar associados à resistência (Perdigão, 2006).

No presente estudo foi estudada a região determinante da resistência à rifampicina do gene *rpoB*, tendo em consideração que cerca de 96% das estirpes resistentes à rifampicina possuem mutações, que resultam na alteração de aminoácidos nesta região central bem definida composta por 81 pb (Telenti *et al*, 1993, Mani *et al*, 2001). Pesquisou-se a presença de possíveis mutações através da técnica de DHPLC, que tem sido amplamente usada no rastreio de mutações associadas à resistência aos antibacilares (Cooksey, 2002; Shi *et al*, 2006; Yip *et al*, 2006; Evans *et al*, 2008). Selecionou-se esta técnica para realização deste trabalho por ser uma técnica simples, rápida, precisa e relativamente barata em comparação com a técnica de sequenciação de DNA (Xiao & Oefner, 2001; Cooksey *et al*, 2002; Shi *et al*, 2006; Evans *et al*, 2008). Nos últimos anos têm aparecido diversos artigos que documentam a óptima sensibilidade e especificidade da técnica de DHPLC na detecção de mutações (Xiao & Oefner, 2001; Cooksey *et al*, 2002; Evans *et al*, 2008). O seu sucesso depende, contudo, de determinados parâmetros que incluem tamanho do fragmento, temperatura da coluna e percentagem do tampão de eluição.

Para otimizar a técnica de DHPLC usou-se como controlo a estirpe *M. tuberculosis* H37Rv e foram usados 19 isolados clínicos provenientes de hospitais portugueses, dos quais 14 eram resistentes e 5 susceptíveis à rifampicina. Após optimização da técnica, as condições escolhidas para análise das mutações no gene *rpoB* foram: fragmento de 369 pb, temperatura da coluna de cromatografia de 66°C e percentagem de tampão B 58%. No que diz respeito ao parâmetro da temperatura, verificou-se uma determinada discrepância entre a temperatura teórica e a temperatura empírica. No estudo de Jones *et al* (1999), foram analisadas 103 mutações, das quais quatro foram detectadas 2°C acima da temperatura recomendada. (Jones *et al*, 1999). Podem ocorrer discrepâncias entre a temperatura

teórica e a temperatura óptima determinada experimentalmente (1 a 2°C acima da temperatura teórica). Não se sabe, actualmente, o porquê do programa estimar, por vezes, temperaturas abaixo da temperatura óptima de análise (Xiao & Oefner, 2001).

Os resultados obtidos pela técnica de DHPLC para os 19 isolados clínicos revelaram uma sensibilidade e especificidade de 100%, uma vez que foram concordantes com os resultados do teste de susceptibilidade aos antibióticos (TSA), ou seja, 14 isolados resistentes apresentaram um perfil de heteroduplexe e os 5 isolados sensíveis um perfil de homoduplexe de DNA. Relativamente aos heteroduplexes, foi evidente a existência de três perfis distintos, que correspondiam a três mutações diferentes, confirmadas posteriormente por sequenciação.

Os resultados da sequenciação revelaram a existência das mutações A516V, H526T e S531L, sendo que cada isolado apresentou apenas uma destas mutações. A mutação A516V foi detectada em 1 isolado (5,3%), a mutação H526T em 1 isolado (5,3%) e a mutação S531L foi a mais frequente presente em 12 isolados (63,1%). Esta maior frequência da mutação S531L está concordante com o estudo de Perdigão *et al* (2008) sobre a resistência aos antibióticos de *M. tuberculosis* em Portugal (Perdigão *et al*, 2008). Outros estudos revelaram, que a taxa de prevalência da mutação S531L variava entre 29-57%, envolvendo quer isolados clínicos (Kapur *et al*, 1994; Williams *et al*, 1994; Ma *et al*, 2006), quer mutantes gerados *in vitro* (Huitric *et al*, 2006).

Após amplificação por PCR de 94 amostras, fez-se primeiramente o rastreio, por DHPLC, de eventuais mutações no fragmento do gene *rpoB* e depois a sua confirmação por sequenciação.

Em relação aos resultados da técnica de DHPLC observou-se que das 94 amostras analisadas, 64 (68%) obtiveram um perfil de homoduplexe, ou seja, um perfil igual ao da estirpe selvagem sem alteração e 30 amostras (32%) evidenciaram um perfil de heteroduplexe, indicativo da presença de uma alteração. Entre as amostras onde foram detectadas mutações foi visível a existência de dois perfis diferentes, correspondentes a duas alterações distintas.

Os resultados da sequenciação revelaram que 3 amostras (3,2%) apresentavam a mutação S531L, implicada na resistência à rifampicina, e 27 amostras (28,7%) apresentavam uma mutação nova S469L, sendo o seu envolvimento na resistência ainda desconhecido.

A mutação S469L encontra-se fora da região determinante da resistência à rifampicina (81pb) do gene *rpoB*, onde estão descritas a maioria das mutações que conferem resistência a este antibiótico (Telenti *et al*, 1993, Mani *et al*, 2001, Van Der Zanden *et al*, 2003). Outros estudos revelaram também a existência de mutações fora desta região que estão relacionadas com a resistência à rifampicina como as mutações I572F (Evans *et al*, 2008), V146F (Heep *et al*, 2001), E472S (Lopez-Alvarez *et al*, 2010) ou mutações que não estão relacionadas com a resistência como M482T (Evans *et al*, 2008).

Com intuito de se compreender melhor esta mutação, realizou-se um genomic BLAST no NCBI, tendo-se constatado que nenhuma estirpe do complexo *M. tuberculosis* apresentava alteração no codão 469, com excepção da estirpe *Mycobacterium tuberculosis* K85. *M. tuberculosis* K85 é uma estirpe bem caracterizada (Kremer *et al*, 1999; Mostowy *et al*, 2004), tendo sido primeiramente isolada na Holanda. Esta estirpe, inicialmente descrita como *M. bovis*, com características próprias, acabou por ser considerada *M. tuberculosis*, sendo designada na base de dados do NCBI como *M. tuberculosis* K85. No entanto, estudos moleculares mais recentes usando deleções genómicas para discriminar os

membros de complexo *M. tuberculosis*, confirmaram que esta estirpe faz parte do grupo *M. africanum* subtipo I, sendo definida pela ausência das regiões genômicas RD7, RD8, RD9 e RD10 (Salamon *et al*, 2000; Mostowy *et al*, 2004).

Através do alinhamento a partir do programa BioEdit, foi possível não só averiguar a especificidade do conjunto de “primers” usado na amplificação do fragmento de 369 pb do gene *rpoB*, como também verificar a presença da alteração aminoacídica na estirpe *M. tuberculosis* K85. Para tal, foram incluídas sequências de várias estirpes de referência de micobactérias, algumas de complexo *M. tuberculosis* nomeadamente *M. tuberculosis* K85, e bactérias pertencentes a géneros aparentados, que se encontram na base de dados GenBank.

Embora, o conjunto de “primers” usado não seja apenas específico do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, as restantes espécies abrangidas não estão tão frequentemente relacionadas com infecções respiratórias. Estas espécies incluem: micobactérias patogénicas para o Homem responsáveis por infecções cutâneas (*M. ulcerans* e *M. marinum*); micobactérias oportunistas frequentes em doentes imunodeprimidos (*M. kansasii*); micobactérias, geralmente, associadas a traumatismos (complexo *Mycobacterium fortuitum* e *M. abscessus*), micobactérias do complexo *Mycobacterium avium* que causam mais frequentemente infecções disseminadas em doentes com SIDA e outras micobactérias raramente isoladas (como *M. goodii* e *M. wolinskyi*) (Cernoch *et al*, 1994).

Estudos realizados na Guiné-Bissau evidenciaram que as espécies de micobactérias mais frequentes neste país pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* e complexo *Mycobacterium avium* (Koivula, 2004). Apesar do conjunto de “primers” usado não permitir a distinção entre os membros destes dois complexos, em África a maioria dos casos de tuberculose pulmonar em adultos é essencialmente devido a *M. tuberculosis*. Um estudo realizado na Guiné Equatorial revelou que 98,3% (241/244) dos isolados clínicos pertenciam ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (sendo a quase totalidade dos casos *M. tuberculosis*) (Tudó *et al*, 2004). Outro estudo realizado em Moçambique também evidenciou que 99% (274/277) das culturas foram positivas para *M. tuberculosis* e 0,7% para *M. avium* (Nunes *et al*, 2008).

Na maioria dos países em desenvolvimento, onde se encontram o maior número de casos de tuberculose, a TB-MR é apenas diagnosticada após prolongado tratamento com os antibióticos de primeira linha e reconhecimento, por parte do clínico, da falência do tratamento. Deste modo, o tratamento de TB-MR é definido sem conhecimento prévio da resistência aos antibióticos. Esta situação potencia consequências adversas como: o doente permanecer num tratamento inadequado durante mais tempo, aumento do risco do tratamento falhar ou morte; aumento da resistência entre estirpes inicialmente susceptíveis; doente permanecer infectado, promovendo a transmissão aos contactos próximos (Dorman & Chaisson, 2007).

O “gold standard” para o diagnóstico de TB multirresistente é demonstrado pelo crescimento de *Mycobacterium* spp. em culturas inoculadas com isoniazida e rifampicina, durando algumas semanas (Srisuwanvilai *et al*, 2008). Novas técnicas têm sido desenvolvidas para detectar a resistência usando o genótipo, em vez do fenótipo. O teste GenoType[®] MTBDR_{plus} é uma destas técnicas, podendo ser aplicado em culturas ou amostras clínicas pulmonares com microscopia positiva. O resultado pode ser

obtido em oito horas, o que permite não só acelerar o diagnóstico de TB-MR como melhorar o seu controlo.

Neste trabalho, recorreu-se ao teste GenoType® MTBDR_{plus} com o objectivo de verificar a existências de casos de multirresistência nas amostras provenientes do Hospital de Cumura. Os resultados evidenciaram apenas um caso de TB-MR, com as mutações S531L no gene *rpoB* e S315T no gene *katG* que conferem resistência à rifampicina e isoniazida, respectivamente.

As mutações que se encontram fora da zona RRDR do gene *rpoB*, bem como mutações menos frequentes para as quais não existe sonda específica, não são identificadas pelo teste GenoType® MTBDR_{plus}. Deste modo, a mutação S469L não é detectável por este teste. No entanto, do conjunto das 27 amostras, onde foi detectada esta mutação, 14 foram testadas com este método de forma a caracterizar a resistência à isoniazida e os resultados obtidos não evidenciaram resistência à isoniazida. Deste modo, não é possível para já afirmar que são casos de monorresistência, pois é desconhecida a implicação da mutação S469L na resistência à rifampicina.

De futuro, seria fundamental averiguar a implicação da mutação S469L na resistência à rifampicina, sobretudo através da realização de testes de susceptibilidade aos antibióticos. Assim, seria necessário fazer cultura a partir das amostras biológicas, processadas pelo método de digestão e descontaminação com NALC-NaOH (que é um método compatível com a realização posterior da cultura), que evidenciaram no estudo molecular a presença da mutação S469L.

Por outro lado, seria interessante realizar estudos genotípicos, que permitissem confirmar a possibilidade da mutação S469L estar relacionada com a estirpe *M. tuberculosis* K85. Para tal, seria necessário recorrer à técnica de “Spoligotyping” que permite a detecção e diferenciação dos vários membros de complexo *M. tuberculosis*, nomeadamente identificação de *M. africanum* (David, 2008). Também seria útil verificar, através de estudos moleculares de deleções genómicas, se os isolados com a mutação S469L possuem um perfil de deleções genómicas semelhante ao já descrito para a estirpe *M. tuberculosis* K85 (ausência das regiões genómicas RD7, RD8, RD9 e RD10) (Salamon et al, 2000; Mostowy et al, 2004). Porém, não se pode excluir o facto desta nova mutação S469L poder ser um possível marcador molecular da estirpe *M. tuberculosis* K85.

VI. CONCLUSÃO

Apesar dos esforços louváveis por parte dos países africanos e parceiros em implementar as estratégias recomendadas internacionalmente para o controlo da tuberculose, o impacto na sua incidência não tem sido significativo. A elevada taxa de incidência é fustigada pela infecção VIH, pela pobreza e pelos conflitos sociais.

O presente estudo teve como objectivos a identificação molecular de mutações implicadas na resistência à rifampicina de complexo *M. tuberculosis*, avaliação do Método da Lixívia no processamento das amostras, implementação da técnica de DHPLC no rastreio rápido de mutações num fragmento do gene *rpoB* e a pesquisa da existência de casos de TB-MR em indivíduos da Guiné-Bissau.

Neste trabalho foram incluídos 96 indivíduos com diagnóstico presuntivo de tuberculose, dos quais 18% estavam infectados pelo VIH-1 e 2% pelo VIH-2 (2%), havendo um caso de co-infecção com os dois tipos de vírus, estando estes valores de acordo com a situação actual da Guiné-Bissau, relativamente à infecção VIH. No que diz respeito à adesão ao tratamento com antibacilares, verificou-se que 48% concluiu e 32% abandonou o tratamento. Esta taxa de abandono elevada é preocupante, na medida em que estes doentes poderão não só transmitir a doença a outros indivíduos, assim como pode ocorrer aquisição, de resistências aos antibióticos.

O Método da Lixívia, usado no tratamento das amostras do Hospital de Cumura, foi avaliado quanto à capacidade de melhorar a sensibilidade da microscopia e à sua aplicabilidade para continuação do estudo molecular. A análise estatística revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas nos resultados da baciloscopia obtidos antes e depois da aplicação do método. Concluiu-se que este método, com etapa de concentração da amostra, permite aumentar a sensibilidade da microscopia, proporcionando um melhor resultado no diagnóstico. O sucesso de amplificação de DNA para as 94 amostras seleccionadas permitiu averiguar que o Método da Lixívia é compatível com posterior análise molecular.

Para identificação molecular de mutações implicadas na resistência à rifampicina de complexo *M. tuberculosis*, fez-se primeiramente um rastreio para detecção rápida de mutações num fragmento do gene *rpoB*, através da técnica de DHPLC após optimização desta técnica em isolados clínicos (14 resistentes e 5 susceptíveis à rifampicina). Os resultados obtidos para os isolados revelaram uma especificidade e sensibilidade de 100% desta técnica. A confirmação da existência de eventuais mutações foi confirmada por sequenciação que revelou que a resistência à rifampicina era sobretudo devida à mutação S531L (63,1%) no gene *rpoB*.

A técnica de DHPLC revelou que, para as 94 amostras provenientes da Guiné-Bissau analisadas, 64 (68%) apresentaram perfil de homoduplexe e 30 amostras (32%) perfil de heteroduplexe, indicativo da presença de mutação. A análise das sequências revelou que 3 amostras (3,2%) apresentavam a mutação S531L e 27 amostras (28,7%) apresentavam uma nova mutação S469L, que se encontra

fora da região determinante da resistência à rifampicina do gene *rpoB*, sendo ainda desconhecida a sua implicação na resistência.

A realização de um genômico BLAST no NCBI, permitiu averiguar que esta mutação (alteração no codão 469) não estava presente em nenhuma estirpe de complexo *M. tuberculosis*, com excepção da estirpe *M. tuberculosis* K85. Estudos moleculares mais recentes, com base nas deleções genómicas, constataram que esta estirpe está incluída no grupo *M. africanum* subtipo I. O facto de esta mutação ter sido a mais frequente nas amostras provenientes de África, está em concordância com a eventual possibilidade desta mutação poder ser um possível marcador molecular da estirpe *M. tuberculosis* K85.

Deste modo, a realização de TSA e estudos genotípicos são fundamentais para confirmarem, respectivamente, o fenótipo de resistência e/ou confirmar a possível presença desta estirpe.

Para averiguar a existência de casos de TB-MR, aplicou-se o teste GenoType® MTBDR_{plus}, que revelou a existência de um caso de multirresistência (mutação S531L no gene *rpoB* e mutação S315T no gene *katG*).

Os resultados do presente estudo indicam a necessidade de uma rigorosa fiscalização do tratamento directamente observado de curta duração, com intuito de minimizar a taxa de abandono do mesmo. Uma melhor vigilância, através da coordenação dos programas do controlo da TB e VIH, dos indivíduos em maior risco, incluindo os co-infectados, é fundamental para a melhoria da prevenção e do tratamento destes. Estas medidas poderão ter repercussões na diminuição do aparecimento de casos de monorresistência e de multirresistência.

Assim solução do problema mundial da tuberculose não passa apenas por antibióticos novos mais eficazes, mas também requer, sobretudo, uma estratégia bem adequada à realidade de cada país e uma organização que a suporte.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albuquerque MF, Leitão C, Campelo AR *et al* (2001). Fatores prognósticos para o desfecho do tratamento da tuberculose pulmonar em Recife, Pernambuco, Brasil. *Rev Panam Salud Publica*; 9(6): 369-375.
2. Andersson S, Norrgren H, Dias F, *et al*. 1999. Molecular Characterization of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 and -2 in Individuals from Guinea-Bissau with Single or Dual Infections: Predominance of a Distinct HIV-1 Subtype A/G Recombinant in West Africa. *Virology*, 262: 312-20.
3. Ängeby KA, Hoffner SE, Diwan VK. (2004). Should the 'bleach microscopy method' be recommended for improved case detection of tuberculosis? Literature review and key person analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*; 8(7): 806-15.
4. Apers L, Wijarajah J, Mutsvangwa J *et al* (2004). Accuracy of routine diagnosis of pulmonary tuberculosis in an area of high HIV prevalence. *Int J Tuberc Lung Dis*; 8: 945–51.
5. Aranaz A, Cousins D, Mateos A *et al* (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J System Evol Microbiol*; 53: 1785-1789.
6. Azevedo-Pereira JM. Ciclo Biológico de VIH In *Manual sobre SIDA*, 3ª Edição, Antunes F (ed.), 2008, Permanyer Portugal, Lisboa, pp. 9-21.
7. Belisie JT and Sonnenberg MG, Chapter 3 Isolation of genomic DNA from Mycobacteria. In *Mycobacterial Protocol* vol.101, Parish T and Stoker NG, 1998, Human Press Inc., New Jersey, pp. 31-44.
8. Bloom BR and Murray CJ (1992). Tuberculosis: commentary on a reemergent killer, *Science*, 257: 1055-64.
9. Bonnet M, Ramsay A, Githui W *et al* (2008). Bleach Sedimentation: An Opportunity to Optimize Smear Microscopy for Tuberculosis Diagnosis in Settings of High Prevalence of HIV. *Clin Infec Dis*; 46: 1710–1716.
10. Boonaiam S, Chaiprasert A, Prammananan T *et al* (2010). Genotypic analysis of genes associated with isoniazid and ethionamide resistance in MDR-TB isolates from Thailand. *Clin Microbiol Infect*; 16: 396-399.
11. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M *et al* (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 3684–3689.
12. Campos HS (1999). *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem a resistência? *Boletim de Pneumologia Sanitária*; 7: 51-64.
13. CDC 2003 - Advanced Course on AFB Microscopy, Nairobi, Kenya November 17-28, 2003. Disponível em: www.cdc.gov/dls/ILA/Training%20Workshops/Kenya1103/Ch1/Module1Intro.rtf
14. CDC 2007 - Division of Tuberculosis Elimination — Faqs. Centers for Disease Control: Atlanta, GA. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/faqs/default.htm>.
15. Cernoch PL, EnnsRK, SaubolleMA *et al*, *Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses*. Cumitech 16A, American Society for Microbiology, Washington DC, October 1994.
16. Coll, P (2003). Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infec Microbiol Clin*; 21: 299–308.
17. Cooksey RC, Morlock GP, Holloway BP *et al* (2002). Temperature-mediated heteroduplex analysis performed using Denaturing High Performance Liquid Chromatography to identify sequence polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *J Clin Microbiol*; 40: 1610-1616.
18. Cousins DV, Bastida, R, Cataldi, A *et al* (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*; 53: 1305-1314.
19. Crick DC, Mahapatra S and Brennan PJ (2001). Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology*; 11: 107R-118R.
20. David HL (1970) Probability distribution of drug resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Applied Microbiology*; 20: 810-814.
21. David H, Brander E, Casal-Roman M *et al*, *Micobacteriologia clínica e de saúde pública – Manual da Sociedade Europeia de Micobacteriologistas*. Preparado por um grupo *ad hoc*, 1986, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.
22. David H, Brum L e Prieto E, Parte 1. Trasmissão e Patogénese das Micobacterioses. In *Manual de Micobacteriologia em Saúde Pública: Princípios e Métodos*. David H, Brum L e Prieto E (eds.), 1994, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micobartérias, Lisboa.
23. David SB e David HL (1998). Estratégia clínico-laboratorial frente à tuberculose multirresistente. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*; 21: 45-53.

24. David S (2008). Utilização estratégica da genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis* no controlo da tuberculose. *Revista Portuguesa de Pneumologia*; XIV: 509-516.
25. DGS 2009 - Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose (PNT), Dia Mundial da Tuberculose, Situação epidemiológica da tuberculose e resultados em Dezembro de 2008. Direção Geral de Saúde, Divisão de Doenças Transmissíveis.
26. DGS 2010 - Stop TB 2010 – Relatório para o Dia Mundial da Tuberculose, Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose (PNT), Ponto da situação epidemiológica e de desempenho; Março 2010.
27. Doetsch RN (1978). Benjamim Marten and his “new theory of consumptions”. *Microbiol Rev*; 42: 521-528.
28. Dorman SE and Chaisson RE (2007). From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nat Med*; 13: 295-298.
29. Drobniewski FA and Wilson SM (1998). *The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis – a molecular story. J Med Microbiol*; 47: 189-196.
30. Duarte R, Carvalho A, Ferreira D *et al* (2010). Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação. *Revista Portuguesa de Pneumologia*; XVI: 559-572.
31. Evans JT, Parveen A, Smith GE *et al* (2009). Application of denaturing HPLC to rapidly identify rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in low- and high-prevalence areas. *J Antimicrob Chemother*; 63: 295-301.
32. Ewen KR, Bahlo M, Treloar SA *et al* (2000). Identification and analysis of error types in high-throughput genotyping. *Am J Hum Genet*; 67: 727-736.
33. Guillemin M, Usdin M and Arkininstall J (2006). Tuberculosis diagnosis and drug susceptibility testing: an overview of the current diagnostic pipeline. *Médecins Sans Frontières*.
34. Haas WH, Bretzel G, Amthor B *et al* (1997). Comparison of DNA fingerprint patterns of isolates of *Mycobacterium africanum* from east and West Africa. *J Clin Microbiol*; 35: 663–666.
35. Heep M, Brandstatter B, Rieger U *et al* (2001). Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant to clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolate. *J Clin Microbiol*; 39:107-110.
36. Huitric E, Werngren J, Juréen P *et al* (2006). Resistance levels and *rpoB* gene mutations among in vitro-selected rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 50: 2860-2862.
37. Israel H, Hetherington H and Ord JA (1941). A study of tuberculosis among students of nursing. *JAMA*; 117: 461-473.
38. Jawahar MS (2004) Current trends in chemotherapy of tuberculosis. *Indian J Med Res*; 120.4: 398-417.
39. Jones AC, Austin J, Hansen N *et al* (1999). Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem*; 45: 1133-1140.
40. Kapur V, Li LL, Iordanescu S *et al* (1994). Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol*; 32: 1095-1098.
41. Keeler E, Perkins MD, Small P *et al* (2006). Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. *Nature*; 444(Suppl 1): 49–57.
42. Kim BJ, Hong SK, Lee KH *et al* (2004). Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous *Mycobacteria* by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol*; 42: 1308-1312.
43. Koch R (1932). Die Aetiologie der Tuberculose. *Am Rev Tuberc*; 25: 285-323.
44. Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R *et al* (1999). Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol*; 37: 2607–2618.
45. Kristiki A and Melo FAF, Chapter 15: Tuberculosis in Adults. *In Tuberculosis 2007, From Basic Science to Patient Care*. First Edition; Palomino JC, Leão SC and Ritacco V (eds.), 2007, www.tuberculosisistextbook.com, pp. 487-524.
46. Lienhardt C, Rodrigues LC (1997). Estimation of the impact of the human immunodeficiency virus infection on tuberculosis: tuberculosis risks revisited? *Int J Tuberc Lung Dis*; 1: 196-204.
47. Ling DI, Zwerling AA, Pai M (2008). GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Eur Respir J*; 32: 1165-1174.
48. Lopez-Alvarez R, Badillo-Lopez C, Cerna-Cortes JF *et al* (2010). First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance. *BMC Microbiology*; 10: 82-94.

49. Ma X, Wang H, Deng Y *et al* (2006). *rpoB* gene mutations and molecular characterization of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Shandong province, China. *J Clin Microbiol*; 44: 3409-3412.
50. Macedo R, Amorim A e Pereira E (2009). Tuberculose multirresistente: detecção directa em amostras respiratórias com o método de genética molecular MTBDRplus®. *Revista Portuguesa de Pneumologia*; XV: 353-365.
51. Macedo R, Perdigão J, Portugal I *et al* (2007). MDR-TB in Lisbon area: data report from 2004 to 2006. 28th Annual Congress of European Society of Myco-bacteriology (Abstract book): 37.
52. Mani C, Selvakumar N, Narayanan S *et al* (2001). Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India, *J Clin Microbiol*; 39: 2987-2990.
53. Manjuba C (2007). Vigilância Epidemiológica da Tuberculose na República da Guiné-Bissau. [Dissertação de Mestrado] São Paulo; Faculdade de Saúde Pública da USP.
54. Mase SR, Ramsay A, Ng V *et al* (2007). Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis*; 11: 485–95.
55. Master RN, Section 3. Mycobacteriology. In *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd Edition, Isenberg HD (ed.), 2004, American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 3.4.1-3.5.11.
56. Miller LP, Crawford JT and Shinnick TM (1994). The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*; 38: 805-811.
57. Miotto P, Saleri N, Dembelé M *et al* (2009). Molecular detection of rifampin and isoniazid resistance to guide chronic TB patient management in Burkina Faso. *BMC Infectious Diseases*; 9: 142.
58. Mostowy S, Cousins D, Brinkman J *et al* (2002). Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Infect. Dis*; 186:74–80.
59. Mostowy S, Onipede A, Gagneux S *et al* (2004). Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol*; 42: 3594-3599.
60. Murray PR, Rosenthal KS, Pealler MA, Capítulo 29 *Mycobacterium In Microbiologia Médica*, tradução da 5ª Edição, Murray PR, Rosenthal KS, Pealler MA (eds.), 2006, Elsevier Editora Ltda, pp.289-302.
61. Nunes EB, De Capitani EM, Coelho E *et al* (2008). Doença pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não-tuberculosas entre pacientes recém-diagnosticados como HIV positivos em Moçambique, África. *J Bras Pneumol*; 34: 822-828.
62. Oefner PJ and Underhill PA (1998). DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Curr. Protocols Hum. Genet*; 19(Suppl.): 7.10.1-7.10.12.
63. Parsons LM, Brosch R, Cole ST *et al* (2002). Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J. Clin. Microbiol*; 40: 2339–2345.
64. Perdigão J (2006). Caracterização de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*, por análise mutacional dos genes associados à resistência. [Relatório Final de Curso Pós-Graduado de Especialização em Biologia], Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.
65. Perdigão J, Macedo R, João I *et al* (2008). Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. *Microbial Drug Resistance*; 14: 137-143.
66. Pina J, A Tuberculose através dos seus marcos históricos. In *A Tuberculose na viragem do milénio*, Pina J, 2000, Lidel – Edições Técnicas, Lisboa; pp. 9-18.
67. Rastogi N, Legrand E and Sola C (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*; 20: 21-54.
68. Rastogi N., Hellio R and David HL (1991). A new insight into the mycobacterial cell envelope by the localization of antigens in ultrathin sections. *Zbt Bakt*; 275: 287-302.
69. Ritacco V, Leão SC and Palomino JC, Chapter 20: New Developments and Perspectives. In *Tuberculosis 2007, From Basic Science to Patient Care*. First Edition; Palomino JC, Leão SC and Ritacco V (eds.), 2007, www.tuberculosistextbook.com, pp. 661-679.
70. Runyon EH (1959). Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am*; 43: 273-290.
71. Salamon H, Kato-Maeda M, Small PM *et al* (2000). Detection of deleted genomic DNA using a semiautomated computational analysis of GeneChip data. *Genome Res*; 10: 2044–2054.
72. Schroeder EK (2002). Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*; 3: 197-225.
73. Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA *et al* (1989). A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*; 320: 545-550.
74. Shi R, Otomo K, Yamada H *et al* (2006). Temperature-mediated heteroduplex analysis for the detection of drug-resistant gene mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. *Microbes and Infection*; 8: 128–135.

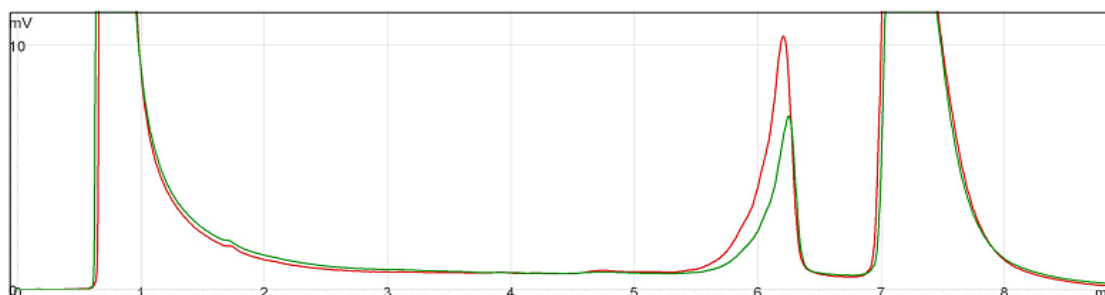
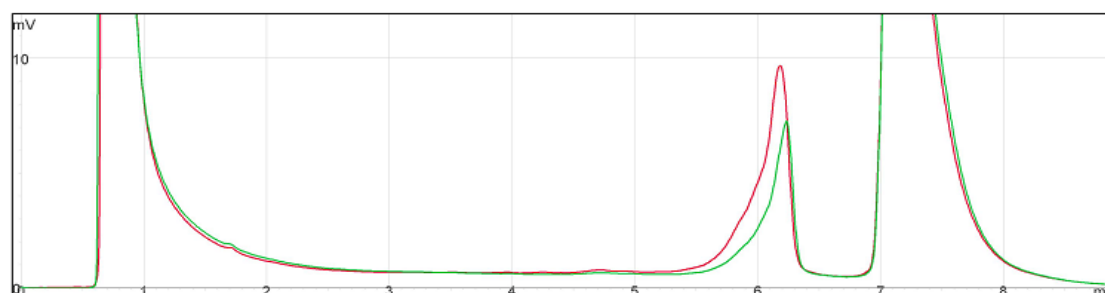
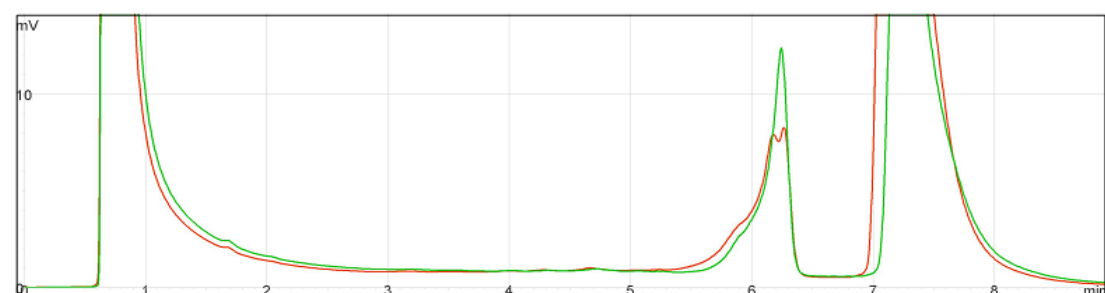
75. Smith I (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence, *Clinical Microbiology Reviews*; 16:3.
76. Soini H and Musser JM (2001). Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem*; 47: 809-814.
77. Somoskovi A, Parsons LM and Salfinger M (2001). The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*; 2: 164-8.
78. Sousa JPC, Rodrigues AM e Exposto F, *Mycobacterium*. In *Microbiologia*, Ferreira WFC e Sousa JCF (eds.), 2000, Lidel - Edições Técnicas, Lisboa; pp. 85-98.
79. Srisuwanvilai LO, Monkongdee P, Podewils LJ *et al* (2008). Performance of the BACTEC MGIT 960 compared with solid media for detection of *Mycobacterium* in Bangkok, Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 61: 402-407.
80. Steingart KR, Ng V, Henry M, *et al* (2006). Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*; 6: 664-74.
81. Steingart KR, Ramsay A, Pai M (2007). Optimizing sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 5:327-31.
82. Suresh N, Singh UB, Arora J *et al* (2006). rpoB gene sequencing and spoligotyping of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from India. *Infection, Genetics and Evolution*; 6: 474-483.
83. Telenti A, Imboden P, Marchesi F *et al* (1993). Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 341: 647-650.
84. Tortoli E (2003). The new mycobacteria: na update, *FEMS Immunol Med Microbiol*; 48:159-178.
85. Van Der Zanden AG, Te Koppelaar-Vije EM, Bhanu NV *et al* (2003). Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*; 41: 1101-1108.
86. Tudó J, González R, Obama JM *et al* (2004). Study of resistance to anti-tuberculosis drugs in five districts of Equatorial Guinea: rates, risk factors, genotyping of gene mutations and molecular epidemiology. *Int J Tuberc Lung Dis*; 8:15-22.
87. Van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE *et al* (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Cannetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J System Evol Microbiol*; 47: 1236-1245.
88. Van Soolingen D, Haas PEW and Kremer K, *Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria*. National Institute of Public Health and the Environment. Bilthoven, The Netherlands. Version September 1999.
89. Varadaraj K and Skinner DM (1994). Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplifications of a G+C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene*; 140: 1-5.
90. Waard JH and Robledo J, Chapter 12: Conventional Diagnostic Methods. In *Tuberculosis 2007, From Basic Science to Patient Care*. First Edition; Palomino JC, Leão SC and Ritacco V (eds.), 2007, www.tuberculosis textbook.com, pp. 401-424.
91. Wayne LG and Kubica GP, Family *Mycobacteriaceae*: Genus *Mycobacterium*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology vol II*, Wayne LG and Kubica GP (eds.), 1986, Williams Wilkins, New York, pp. 1436-1457.
92. World Health Organization (WHO): *The StopTB Strategy, Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals*; WHO; 2006 (WHO/HTM/TB/2006.368).
93. World Health Organization (WHO): *Anti-Tuberculosis Drug-Resistant Tuberculosis in the World – Fourth Global Report*. Geneva: WHO; 2008 (WHO/HTM/TB/2008.394).
94. World Health Organization (WHO): *Global Tuberculosis Control: Epidemiology, Strategy, Financing - Report 2009*. WHO; 2009 (WHO/HTM/TB/2009.411).
95. Williams DL, Waguespack C, Eisenach K *et al* (1994). Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 38: 2380-2386.
96. Wollinsky E, *Mycobacteria*. In *Microbiology*, Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS (eds.), 1990, J. B. Lippincott Company: Philadelphia, EUA; pp. 647-664.
97. Xiao W and Oefner PJ (2001). Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Human Mutation*; 17: 439-474.
98. Yip CW, Leung KL, Cheung DTL *et al* (2006). Denaturing HPLC for high-throughput screening of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Tuberc Lung Dis*; 10: 625-630.
99. Zacarias JS, Oliveira I, Andersena A *et al* (2008). Changes in prevalence and incidence of HIV 1, HIV-2 and dual infections in urban areas of Bissau, Guinea-Bissau: is HIV-2 disappearing? *AIDS*; 22: 1195-1202.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Cromatogramas para as várias temperaturas testadas. Em cada cromatograma é possível identificar 3 zonas correspondentes à injeção das amostras, ao perfil da amostra (onde se detectam as diferenças) e à lavagem da coluna.

Legenda:

- Controlo negativo (estirpe selvagem)
- Controlo positivo (mutação)

64,5°C**65 °C****65,5°C****66°C**