



**Cristina Isabel Lopes  
Ferro**

**Detecção de *M. tuberculosis* resistente à isoniazida  
por PCR-TR**



**Cristina Isabel Lopes  
Ferro**

**Detecção de *M. tuberculosis* resistente à isoniazida  
por PCR-TR**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoléculares Avançados, realizada sob a orientação científica do Doutor Pedro Domingues, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Anabela Miranda, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Apoio financeiro da Fundação Calouste  
Gulbenkian (Projecto nº 55088).

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha irmã, aos meus avós e ao Walter,  
o meu namorado.  
Sem o vosso apoio a elaboração desta dissertação não teria sido possível...

## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva**  
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**  
professor auxiliar da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Paulo Manuel de Castro Pinho Costa**  
professor auxiliar convidado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

**Dr. Anabela Medo Miranda**  
Investigadora auxiliar do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

## **agradecimentos**

Agradeço à Doutora Anabela Miranda e à Dr. Filomena Rodrigues todo o apoio e disponibilidade oferecida.

Agradeço ao Doutor Pedro Domingues e ao Doutor Francisco Amado todo o apoio que me prestaram.

A todos os outros colaboradores do Centro de Tuberculose e Micobactérias do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Delegação no Porto, em especial, a Dr. Anabela Silva, a Dr. Maria João, a Dr. Maria Manuela, a Téc. Fernanda, a Téc. Fátima e a Téc. Brigitte:

- Muito obrigada!

## palavras-chave

tuberculose, resistência a drogas, detecção rápida, PCR em tempo real.

## resumo

A tuberculose é um grave problema de saúde pública responsável por cerca de 8 milhões de casos novos de doença e quase 3 milhões de mortes anualmente. O tratamento insuficiente ou inadequado, a toma irregular ou o abandono da terapêutica são as principais causas de desenvolvimento e multiplicação de estirpes resistentes aos fármacos utilizados. Por este motivo, o número de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à rifampicina e isoniazida tem vindo a aumentar, tornando-se urgente a implementação de técnicas rápidas e fiáveis de detecção destas resistências.

A isoniazida é um dos principais antibióticos administrados no tratamento da tuberculose. O mecanismo genético de resistência à isoniazida é complexo, envolvendo mutações nos seguintes genes: catalase-peroxidase (*katG*), enoil-(transportadora de acil) reductase (*inhA*),  $\beta$ -cetoacil-(transportadora de acil) sintetase (*kasA*) e alquil-hidroperóxido reductase (*aphC*). As mutações são geralmente polimorfismos de um só nucleótido, no mesmo codão, que dão origem a um outro aminoácido.

O desenvolvimento de testes genotípicos pode contribuir para a rápida e adequada detecção da infecção por estirpes de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos. Para a elaboração desta dissertação implementou-se uma técnica de PCR em tempo real que permite identificar alterações no codão 315 do gene *katG*. Estas mutações estão relacionadas com o desenvolvimento de elevado nível de resistência à isoniazida. Estudaram-se 71 estirpes de *M. tuberculosis* que apresentam resistência a esta droga pelo método das proporções em *Lowenstein-Jensen*. Em 30% destas estirpes identificou-se a mutação no codão 315 do gene *katG* em que há substituição de uma serina por uma treonina. Não se verificou a presença de outras substituições nesta posição. A metodologia implementada permite a detecção correcta da resistência ao fármaco, abrindo a possibilidade de vir a ser usada em diagnóstico. Foi também possível a adaptação desta metodologia a DNA genómico extraído de esfregaços de exames directos positivos. Deste modo, tornou-se ainda mais rápida a determinação da presença de mutações, não sendo necessário aguardar o crescimento da estirpe.

De futuro, prevê-se a aplicação desta metodologia rápida de forma a identificar mutações neste ou noutros genes que conferem resistências à INH e também a outras drogas utilizadas no tratamento da TB. Assim, torna-se possível caracterizar as estirpes clínicas existentes, e integrar estas técnicas na rotina laboratorial.

**keywords**

tuberculosis, drug resistance, early detection, real-time PCR.

**abstract**

Tuberculosis is a serious public health problem with one third of the world population infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Inappropriate treatment can result in the development of resistant strains. For this reason, the early detection of drug resistance is essential for effective patient management and implementation of infection control measures.

Because *M. tuberculosis* grows extremely slowly, susceptibility testing can take about 3 to 6 weeks to complete. However, in the last few years there has been a considerable progress in our understanding of the mechanisms of action of the anti-mycobacterial agents, and the basis of resistance to these compounds. As a result, a number of novel assays based on real-time PCR technology have recently been developed to detect mutations that confer resistance to anti-tuberculous drugs.

Isoniazid is a critical component of the first-line multidrug therapy of tuberculosis. The molecular basis of antitubercular isoniazid resistance is complex. Resistant strains have been found to contain mutations in the following genes: catalase – peroxidase (*katG*), enoyl-acyl carrier protein reductase (*inhA*),  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase (*kasA*) and alkyl-hydroperoxid reductase (*ahpC*).

The present study reports the use of a real-time PCR assay, in a reference laboratory setting, that can detect mutations that confer resistance to isoniazid. Seventy one *M. tuberculosis* clinical isolates were identified as resistant to isoniazid by the proportion method. From these, about 30% were found to have *katG* Ser315Thr mutation. Other substitutions in this position were not present. In addition, the methodology used allows detection of isoniazid resistance directly from DNA extracted from positive fluorescence stained slides, which contributes to an even more rapid diagnosis.

In the future, novel real time PCR assays aimed at being used on a routine basis will be implemented in order to detect mutations responsible for resistance to other anti-tuberculous drugs.

---

Lista de Abreviaturas	2
Lista de Figuras	6
Lista de Tabelas	7
<b>1. Introdução Teórica</b>	<b>9</b>
1.1. Epidemiologia da Tuberculose	11
1.2. Patogénese da Tuberculose	13
1.3. Características do género <i>Mycobacterium</i>	15
1.4. Tratamento	17
1.5. Diagnóstico	19
1.5.1 Diagnóstico clínico	19
1.5.2 Diagnóstico Laboratorial	20
1.5.3 Testes de sensibilidade a drogas	22
1.5.4 Técnicas de PCR em Tempo Real (PCR-TR)	25
1.6. Mecanismo de Acção INH	31
1.7. Proteína catalase peroxidase	33
1.8. Mecanismo de resistência à INH em estirpes clínicas	35
1.9. Objectivos da tese	39
<b>2. Procedimento Experimental</b>	<b>41</b>
2.1. Reagentes	43
2.2. Instrumentos	44
2.3. Receitas	44
2.4. Procedimentos	45
2.4.1. Extracção de DNA	45
2.4.2. Quantificação de DNA	46
2.4.3. PCR em tempo real	
2.4.4. A rota do DNA/contaminações	47
<b>3. Detecção de Resistência à Isoniazida em <i>M. tuberculosis</i></b>	<b>49</b>
3.1. Detecção de mutações no codão 315 do gene <i>katG</i> de estirpes clínicas de <i>M. tuberculosis</i>	51
3.1.1 Caracterização das estirpes clínicas de <i>M. tuberculosis</i> estudadas	51
3.1.2 Optimização da extracção de DNA genómico de estirpes clínicas de <i>M. tuberculosis</i>	56
3.1.3. Quantificação de DNA genómico de estirpes clínicas <i>M. tuberculosis</i>	57
3.1.4 PCR em tempo real aplicado a DNA genómico de estirpes clínicas <i>M. tuberculosis</i>	59
3.1.5 Optimização e verificação da correcção dos resultados	63
3.1.6. Análise dos resultados obtidos no estudo das estirpes clínicas de <i>M. tuberculosis</i>	64
3.2 Detecção de mutações no codão 315 do gene <i>katG</i> a partir de DNA extraído de exames directos positivos	70
3.2.1 Caracterização dos exames directos positivos estudados	70
3.2.2 Análise dos resultados obtidos no estudo do DNA extraído de exames directos positivos	70
<b>4. Conclusão</b>	<b>73</b>
<b>5. Bibliografia</b>	<b>77</b>

---

A	-	adenina
ACP	-	proteína transportadora de grupos acil
<i>ahpC</i>	-	gene que codifica a <i>AhpC</i>
AhpC	-	proteína alquil –hidroperóxido reductase
Ala		alanina
Arg	-	arginina
Asn	-	asparagina
Asp	-	ácido aspártico
BCG	-	bacilos <i>Calmette e Guérin</i>
C	-	carbono (quando aparece isolado); citosina (quando aparece junto de A, G ou T)
Cat n°	-	catálogo número
CMI	-	concentração mínima inibitória
CTAB	-	hexadeciltrimetilammonium bromido
Cys	-	cisteína
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
DGS	-	Direcção Geral de Saúde
dsDNA	-	DNA de dupla cadeia
EMB	-	etambutol
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetra-acético
FRET	-	“ <i>fluorescence resonance energy transfer</i> ”
<i>furA</i>	-	gene que regula a expressão da <i>KatG</i>
g	-	grama
G	-	guanina
GBM	-	grau de biologia molecular
Gln	-	glutamina
Gly	-	glicina
HCl	-	ácido clorídrico
His	-	histidina
HIV	-	vírus da imunodeficiência humana
H <sub>2</sub> O	-	água

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	peróxido de hidrogénio
Ile	-	isoleucina
INH	-	isoniazida
<i>inhA</i>	-	gene que codifica a <i>InhA</i>
<i>InhA</i>	-	proteína enoil-(transportadora de acil) reductase
INSA	-	Instituto Nacional de Saúde
IUATLD	-	“ <i>International Union Against Tuberculosis and Lung Disease</i> ”
L	-	litro
Leu	-	leucina
<i>kasA</i>	-	gene que codifica a <i>KasA</i>
<i>KasA</i>	-	proteína β-cetoacil-(transportadora de acil) sintetase
<i>katG</i>	-	gene que coficica a <i>KatG</i>
<i>KatG</i>	-	proteína catalase-peroxidase
KCl	-	cloreto de potássio
KDa	-	kilodalton
M	-	molar
MgCl <sub>2</sub>	-	cloreto de magnésio
mm	-.	milimetro
mM	-	milimolar
M.	-	Mycobacterium
mg	-	miligrama
<i>MilliQ</i>	-	água destilada ultrapurificada
min	-	minuto
ml	-	mililitro
mM	-	milimolar
mol	-	mole
m/v	-	massa por volume
μg	-	micrograma
μl	-	microlitro
μm	-	micrometro
N	-	azoto

NaCl	-	cloreto de sódio
NADH	-	“ <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> ”
<i>ndh</i>	-	codifica a NADH desidrogenase
<i>ng</i>	-	nanograma
<i>nM</i>	-	nanomolar
°C	-	grau celsius
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
<i>orfI</i>	-	“ <i>open reading frames</i> ”
<i>oxyR</i>	-	gene que codifica a <i>OxyR</i>
<i>OxyR</i>	-	proteína que apresenta funções de regulador de stress oxidativo
O <sub>2</sub>	-	oxigênio
P.A.	-	para análise
pb	-	par de bases
PCR	-	“ <i>polimerase chain reaction</i> ”
PCR-tr	-	PCR em tempo real
PNT	-	Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose
PZA	-	pirazinamida
pg	-	picograma
pmol	-	picomole
Pro	-	prolina
RFLP	-	“ <i>restriction fragment lenght polymorfism</i> ”
RNAm	-	ácido ribonucleíco mensageiro
RPM	-	rifampicina
rpm	-	rotações por minuto
rRNA	-	ácido ribonucleíco ribossómico
SDS	-	dodecilo hidrogenosulfato, sal sódica
Ser	-	serina
SM	-	estreptomicina
SSCP	-	“ <i>single straind conformational polymorphism</i> ”
SVIG	-	Sistema de Vigilância

T	-	timina
TB	-	tuberculose
TBMR	-	tuberculose multirresistente
TE	-	tris-EDTA
Thr	-	treonina
Tris	-	trizma base - tris(hidroximetil) amino metano
Trp	-	triptofano
UE	-	União Europeia
UV	-	ultravioleta
Val	-	valina
VIH	-	Vírus de Imunodeficiência Humana
WHO	-	ver OMS
/	-	por
X	-	vezes
%	-	percentagem

- Figura 1.1** – Representação esquemática da parede celular do *M. tuberculosis*.
- Figura 1.2** - Esquema do mecanismo de acção das sondas “*TaqMan*”.
- Figura 1.3** - Esquema do mecanismo de acção das sondas “*molecular beacons*”.
- Figura 1.4** - Esquema do mecanismo de acção das sondas “FRET”.
- Figura 1.5** – Mecanismo de activação da isoniazida pela *KatG*.
- Figura 1.6** – Mecanismo de acção da isoniazida.
- Figura 1.7** – Estrutura da *KatG* do *M. tuberculosis*.
- Figura 1.8** – Esquema representativo do mecanismo de acção e aquisição de resistência da isoniazida.
- Figura 3.1** – Representação percentual de estirpes enviadas pelas diferentes zonas do país.
- Figura 3.2** – Percentagem de estirpes enviadas pelas diferentes Instituições.
- Figura 3.3** – Percentagem de estirpes e produto biológico correspondente.
- Figura 3.4** – Exemplo de curvas de calibração utilizadas em cada série de quantificações de DNA genómico de estirpes clínicas de *M. tuberculosis*.
- Figura 3.5** - Esquema representativo do fundamento da técnica utilizada.
- Figura 3.6** – Sequências dos “*primers*” utilizados nos 4 ensaios realizados em paralelo para cada estirpe.
- Figura 3.7** – Exemplo do resultado de reacções de PCR de 2 estirpes diferentes.
- Figura 3.8**– Percentagem dos resultados obtidos para as estirpes estudadas.
- Figura 3.9** – Percentagens de estirpes *katG* 315 “*wild type*” e *katG* Ser315Thr e respectivo nível de resistência à INH.
- Figura 3.10** - Percentagem de estirpes *katG* 315 “*wild type*” e *katG* Ser315Thr de acordo com a sua distribuição geográfica.
- Figura 3.11** - Percentagens de estirpes *katG* 315 “*wild type*” e *katG* Ser 315Thr de acordo com o produto biológico de onde foram isoladas.

**Tabela 1.1** - Percentagens de resistência a drogas usadas no tratamento da tuberculose obtidas no estudo coordenado pela Direcção Geral de Saúde (DGS) e dados do Sistema de Vigilância da tuberculose.

**Tabela 1.2** - Genes de *M. tuberculosis* que quando sofrem determinadas mutações conferem resistência a drogas usadas no tratamento da tuberculose

**Tabela 2.1** – Constituição da mistura *iQ<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup> Green Supermix* da Bio Rad.

**Tabela 3.1**– Número de estirpes enviadas pelas diferentes zonas do país.

**Tabela 3.2** – Número de estirpes enviadas pelas diferentes Instituições.

**Tabela 3.3** – Número de estirpes e produto biológico correspondente.

**Tabela 3.4** – Número de estirpes e percentagem referente ao meio em que foram realizados os testes de sensibilidade a drogas.

**Tabela 3.5** - Resultados obtidos para as estirpes do controlo de qualidade da OMS. Número de estirpes e respectiva mutação identificada.

**Tabela 3.6**- Resultados obtidos para as estirpes clínicas estudadas.

**Tabela 3.7** – Número de estirpes *katG* 315 “wild type” e *katG* Ser315Thr e respectivo nível de resistência à INH.

**Tabela 3.8** – Número de estirpes *katG* 315 “wild type” e *katG* Ser315Thr de acordo com a sua distribuição geográfica pelas zonas consideradas.

**Tabela 3.9** - Número de estirpes *katG* 315 “wild type” e *katG* Ser 315Thr de acordo com o produto biológico de onde foram isoladas.

**Tabela 3.10** – Número de estirpes *katG* 315 “wild type” e *katG* Ser315Thr de acordo com o seu fenótipo.







### 1.1. Epidemiologia da Tuberculose

A tuberculose (TB), uma doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que tem acompanhado a existência do homem na Terra, é nos nossos dias um grave problema de saúde pública.

Existem cerca de mil e setecentos milhões de seres humanos infectados em todo o mundo pelo bacilo da TB, gerando um número elevado de doentes a que corresponde uma mortalidade muito significativa. De acordo com dados recentes, fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), morrem por ano cerca de 3 milhões de pessoas com tuberculose e nos próximos 25 anos estima-se que morrerão mais de 40 milhões de pessoas. Apesar do elevado número de casos a nível mundial, esta doença é menos frequente nos países desenvolvidos. No entanto, 98% do número total de mortes por TB em cada ano ocorrem em países subdesenvolvidos, devido à não implementação de programas de controlo desta doença, principalmente por falta de recursos financeiros (WHO/IUATLD, 1997; WHO/IUATLD, 2000).

De acordo com estatísticas da OMS, a região da Europa Ocidental registou um decréscimo de 4% de casos de TB por ano, enquanto que a Europa de Leste apesar de apresentar uma diminuição de 4% até 1990, tem verificado um aumento de 10% por ano a partir de 1992. Na África Sub-Sahariana tem-se registado um acréscimo do número de casos na ordem dos 10% por ano, na América Latina ocorreu uma diminuição de 2% e na Ásia um aumento de 1 a 2% (WHO/IUATLD, 1997; WHO/IUATLD, 2000). Em Portugal, estão notificados 43.8 casos de TB por 100000 habitantes (WHO, 2003), um valor superior à média Europeia, apresentando um decréscimo de 2,8% do número de casos nos últimos anos. Cerca de 60% da totalidade de casos de TB são pulmonares e em 75% dos casos o tratamento é bem sucedido (WHO/IUATLD, 1997; Pina, 2000).

Nos anos 80, coincidindo com o surgimento de um elevado número de indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), verificou-se também um aumento de casos de tuberculose causados por estirpes resistentes aos antibacilares mais importantes utilizados no tratamento desta doença. Deste modo, a partir da década de 90 têm-se diagnosticado, essencialmente em doentes VIH positivos, situações de tuberculose

multirresistente (TBMR). As estirpes responsáveis pelo desenvolvimento de TBMR apresentam resistência em simultâneo, pelo menos, à isoniazida (INH) e à rifampicina (RPM). Estima-se que 3,2% de todos os novos casos de TB no mundo sejam causados por estirpes que apresentam resistências aos fármacos. Não é possível definir com exactidão o número total destes casos, pois só um limitado número de países, industrializados e desenvolvidos, têm programas e sistemas de controlo que produzem estatísticas fiáveis (WHO/IUATLD, 1997; WHO/IUATLD, 2000; WHO Guideline, 2003; Espinal, 2003; Aaron *et al.*, 2004).

A Europa apresenta uma grande heterogeneidade de prevalência de estirpes resistentes. Em geral, na Europa Ocidental, a resistência a drogas não constitui um grave problema de saúde pública. A média de multirresistência primária (detectada em casos novos antes do início do tratamento ou com tratamento inferior a um mês) é cerca de 1%. Esta percentagem é uma média de todos os países que se incluem nesta zona. No entanto, a Estónia e a Lituânia, entre outros, apresentam dados muito preocupantes, uma vez que apresentam percentagens de multirresistência primária superiores a 1%. A maior parte dos países europeus, principalmente os situados na Europa Central, apresentam situações estáveis e controladas como é o caso da França, Alemanha e República Checa (WHO/IUATLD, 1997; WHO/IUATLD, 2000).

Embora Portugal seja um país da Europa Ocidental, o panorama da TBMR é mais grave do que o dos seus países vizinhos. Entre 1994 e 1997, realizou-se um estudo mundial sobre a TB organizado pela OMS. Portugal participou neste estudo sob a coordenação da Direcção Geral de Saúde (DGS). Foi possível comparar os resultados obtidos neste trabalho com os dados do Sistema de Vigilância (SVIG) da tuberculose adquiridos entre 2000 e 2003. Os resultados mais relevantes encontram-se sumarizados na Tabela 1.1. Entre 1997 e 2003, verificou-se uma diminuição significativa da resistência total (resistência a qualquer droga utilizada no tratamento da TB), de 17,7% a 12,6%. A resistência primária à INH diminuiu ligeiramente, ocorrendo um leve aumento da resistência primária à RPM. A multirresistência primária passou de 1,8% a 2,1%, um aumento que apesar de pequeno é preocupante, visto que estes casos de TB se devem a contágio por estirpes resistentes. A existência de casos de tuberculose com resistências primárias são um indicador da eficácia dos programas de controlo da TB. A resistência nos retratamentos, isto é, em casos com

tratamentos anteriores, diminuiu significativamente, verificando-se uma diminuição de resistência à INH e RPM quase para metade. Contudo, estas percentagens ainda se apresentam elevadas quando comparados com os valores da União Europeia (UE). A média de multirresistência primária na UE é aproximadamente 1%, sendo esta a meta que Portugal se propõe atingir, embora ainda esteja muito aquém deste valor (Programa nacional de Luta Contra a Tuberculose (PNT) - SVIG, 2003).

**Tabela 1.1** - Percentagens de resistência a drogas usadas no tratamento da tuberculose obtidas no estudo coordenado pela Direcção Geral de Saúde (DGS) e dados do Sistema de Vigilância da tuberculose (Adaptado de Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose – DGS, 2003).

<b>Padrões</b>	<b>Estudo DGS/94-97</b>	<b>SVIG – TB 2000 - 03</b>
Resistência total	17,7%	12,6%
Resistência INH primária	7,7%	6,5%
Resistência RPM primária	1,9%	2,5%
Multirresistência primária	1,8%	2,1%
Resistência INH nos retratamentos	31,1%	12,6%
Resistência RPM nos retratamentos	20,9%	8,4%
Multirresistência nos tratamentos	20,9%	7,8%

### 1.2. Patogénese da Tuberculose

O Homem é o principal reservatório natural de *M. tuberculosis* e as vias de transmissão são principalmente inter – individuais. As portas de entrada mais frequentes são o aparelho respiratório (90% dos casos), o tubo digestivo, a conjuntiva ocular, a pele e a via genital. A expressão clínica da tuberculose depende do local/orgão afectado, resultando diferentes formas da doença. A tuberculose pulmonar é a mais frequente. De acordo com a OMS considera-se tuberculose extra - pulmonar todas as outras formas que se localizam fora do pulmão (WHO Guideline, 1997). Os bacilos invadem o organismo humano quase sempre por via inalatória, ultrapassando a barreira mucociliar brônquica e atinge o pulmão

profundo. Aqui, são confrontados com macrófagos, as primeiras células a tentar neutralizá-los. Porém o *M. tuberculosis*, devido às suas características enzimáticas consegue destruir os macrófagos alveolares, originando um ambiente de inflamação/necrose com características particulares - o caseum. Inicia-se um processo de proliferação bacilar designado por foco de inoculação. Se a multiplicação dos bacilos é reduzida ocorre um processo inflamatório inespecífico, tratando-se de uma primo infecção – infecção latente. Esta situação é benigna e geralmente evolui para a cura, com o desaparecimento dos bacilos. Ocorre também uma afluência de plasma, fibrina, neutrófilos e linfócitos formando-se o foco de Ghon. Quando a multiplicação é considerável, a presença dos bacilos, macrófagos e polimorfonucleares causam uma lesão do tipo exsudativo e posteriormente a ocorrência de necrose sólida. Nesta fase e na maior parte das vezes, a evolução consiste na encapsulação da necrose caseosa, com tendência para a autoesterilização espontânea. Os vasos linfáticos drenam os bacilos para os gânglios satélites originando-se o foco ganglionar. Designando-se complexo primário ou de Ghon ao foco de Ghon e ao foco ganglionar. A partir deste, a evolução pode ser desfavorável e levar à formação de uma caverna com proliferação bacteriana. Os bacilos podem propagar-se a todo o organismo através da corrente sanguínea. O *M. tuberculosis*, pode demorar cerca de 20 horas a duplicar-se e apresenta um grande potencial de crescimento a nível extracelular, nas cavernas, e também a nível intracelular dentro das células fagocíticas do hospedeiro (Koneman *et al.*, 1997).

A expressão clínica da infecção por *M. tuberculosis* pode variar dependendo de diferentes factores do hospedeiro, da micobactéria e da interacção entre ambos. Estudos defendem que factores genéticos (sexo, constituição física, hemofilia, entre outros), factores ambientais (abuso de substâncias diversas, alcoolismo, hábitos tabágicos, má nutrição e dieta), patologias associadas (neoplasias, diabetes mellitus, insuficiência renal, corticoterapia), a imunização com bacilos *Calmette* e *Guérin* (BCG) e a situação sócio-económica do hospedeiro influenciam os sinais e sintomas da manifestação da tuberculose (Koneman *et al.*, 1997; Pina, 2000). No que se refere às características do agente causador da doença pode-se referir a virulência da estirpe e a dose infectante (Rhee *et al.*, 1999; Cardona *et al.*, 2003). A manifestação da doença, resultante da interacção do

hospedeiro/agente patogénico depende também do órgão afectado, da gravidade da infecção ou mesmo reinfecção (Bloom, 1995; Koneman *et al.*, 1997; Pina, 2000).

### 1.3. Características do género *Mycobacterium*

Em 1882, foi descoberto por Robert Koch o microorganismo responsável pela tuberculose.

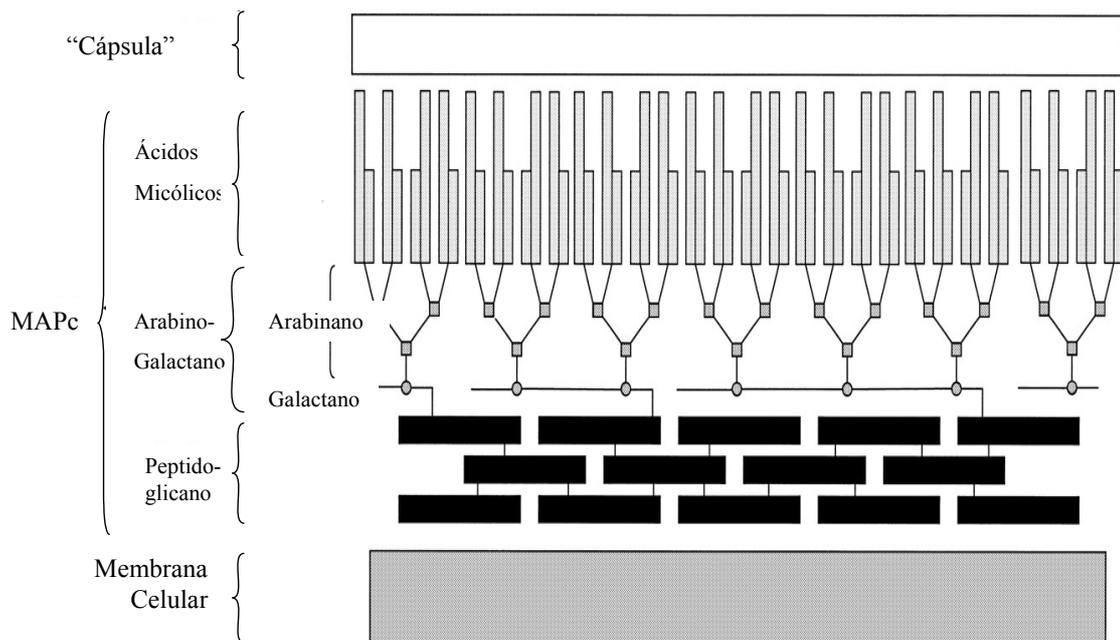
As micobactérias pertencem à vasta família das *Mycobacteriaceae* que engloba um único género, o *Mycobacterium*. São bacilos não capsulados, não esporulados, imóveis, com um comprimento de 2 a 5 µm, sensíveis ao calor e à luz solar, e resistentes ao frio. O género *Mycobacterium* compreende numerosas espécies (Wayne e Kubica, 1986).

O complexo *M. tuberculosis* engloba o *M. tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti* (Wayne e Kubica, 1986; Bloom, 1995; Koneman *et al.*, 1997). Este grupo apresenta uma similaridade de 99,9% no genoma e sequências idênticas de rRNA. Derivam de um ancestral comum, contudo diferem no seu tropismo, fenótipo e patogenicidade (Brosch *et al.*, 2002).

O *M. tuberculosis* não ocorre como microorganismo saprófita ou comensal, apresentando-se como patogénico do Homem. É muito sensível a agentes físicos como o calor, a luz solar, raios X ou raios UV. Resiste bem ao frio e à desidratação, mantendo-se viável por longos períodos nos produtos biológicos contaminados. É pouco sensível a agentes químicos, como ácidos e bases fortes ou detergentes, devido à constituição muito particular da sua parede celular. A parede celular é constituída por três tipos de macromoléculas (Figura 1.1): peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos. O peptidoglicano situa-se do lado externo da membrana celular e estabelece ligações covalentes com o arabinogalactano. Este último, por sua vez, liga-se também de forma covalente aos ácidos micólicos. Os ácidos micólicos são ácidos gordos de cadeia longa, com mais de 90 átomos de carbono, e são responsáveis pela álcool-ácido resistência. A álcool-ácido resistência define-se pela capacidade de resistência à descoloração pelo álcool-ácido, quando corado pela fucsina. Estas macromoléculas ligadas entre si

constituem o Complexo Micolil-Arabinogalactano-Peptidoglicano (Bloom, 1995; Koneman *et al.*, 1997; Crick *et al.*, 2001).

*In vitro*, é possível obter colónias após 2-3 semanas de incubação a 35°C e em meios de cultura (sólidos) que favoreçam o seu crescimento. As colónias ao crescerem são pequenas (1-3 mm), granulares, rugosas, secas e de coloração creme. Após várias semanas de incubação aumentam de tamanho e apresentam uma margem lisa irregular e um centro em “couve – flor”. Este aspecto, apesar de bastante característico, não evita a realização de testes bioquímicos ou moleculares para a correcta identificação da espécie (Bloom, 1995; Konema *et al.*, 1997).



**Figura 1.1** – Representação esquemática da parede celular do *M. tuberculosis* (adaptado de Crick *et al.*, 2001). (MAPc – Complexo Micolil-Arabinogalactano-Peptidoglicano)

### 1.4. Tratamento

Em 1944, passadas várias décadas da identificação do agente infeccioso responsável pela TB, Schatz, Bugie e Waksman descobrem a estreptomicina (SM), o primeiro antimicrobiano eficaz contra o *M. tuberculosis*. Poucos anos depois surgem novas drogas como a INH e a RPM.

Os fármacos mais utilizados na maioria dos esquemas terapêuticos são: INH, pirazinamida (PZA), etambutol (EMB), SM e a RPM, designando-se por drogas de 1ª linha ou essenciais. Em caso de resistência a estes fármacos recorre-se aos chamados de 2ª linha. Os mais utilizados são a etionamida, ofloxacina, cicloserina, kanamicina, amikacina, capreomicina e ácido para-aminosalicílico. São menos eficazes, mais caros e provocam efeitos adversos com maior frequência (WHO Guideline, 2003). Estão descritos fármacos de 3ª linha, mas a sua utilização ainda não é recomendada pela OMS (Chan e Iseman, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004).

Existem esquemas terapêuticos “*standardizados*” pela OMS, que com base na definição de cada caso, considera a maior ou menor prioridade no tratamento (WHO Guideline, 2003). O regime geral de tratamento da tuberculose pressupõe uma administração diária, única e uma prescrição prolongada que consiste numa fase inicial de 2 a 3 meses em que são administradas INH, RPM, PZA e EMB (esta última droga por vezes não é utilizada), seguindo-se um período, geralmente, de 4 meses, em que são prescritas a INH e RPM (Chan e Iseman, 2004). O tratamento quando bem efectuado leva a uma cura em mais de 95% dos casos, mesmo nos indivíduos imunodeprimidos, e tem como objectivo curar o doente tuberculoso, assim como evitar os efeitos tardios da infecção, as recidivas, o desenvolvimento de resistências aos antibacilares e diminuir a transmissão da doença (WHO Guideline, 1997; WHO Guideline, 2003).

Um esquema terapêutico correcto obriga à utilização múltipla de fármacos antibacilares com diferentes propriedades, pois as características dos bacilos têm não só implicações clínicas, mas também terapêuticas. Estas drogas são classificadas de acordo com a sua actividade antibacteriana precoce e capacidade esterilizante (Mukherjee *et al.*, 2004). Nas paredes das lesões caseosas, geralmente existe uma elevada carga bacilar, com capacidade de divisão de 20 em 20 horas em pH neutro, e vulnerável aos fármacos com

características bactericidas, como é o caso da INH. Os bacilos existentes no interior de células, como os macrófagos, multiplicam-se lentamente devido ao baixo pH. Desta forma, fármacos que actuam em meio ácido, como por exemplo, a PZA, são muito eficazes. Em focos caseosos sólidos, onde quase não existe oxigenação, ocorre um crescimento micobacteriano lento, sendo de extrema importância a utilização de drogas com capacidade esterilizante como é o caso da RPM. Estes fármacos também têm especial importância na prevenção de recaídas após o final do tratamento.

O *M. tuberculosis* tem capacidade para desenvolver naturalmente mutantes resistentes aos antibacilares. Durante a multiplicação bacteriana, desenvolvem-se resistências devido à ocorrência de mutações espontâneas no genoma. Mutações que resultam na resistência de *M. tuberculosis* à RPM ocorrem numa proporção de  $10^{-10}$  por divisão celular, levando à formação de 1 bacilo resistente em cada  $10^8$  bacilos sensíveis. No que se refere à INH, as mutações espontâneas que resultam em resistência a este antibiótico ocorrem numa proporção de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$ , isto é, em  $10^6$  bacilos 1 apresentará resistência a esta droga (WHO Guideline, 2003). O aparecimento de estirpes resistentes é, essencialmente, da responsabilidade humana. Os principais factores que estão na génese deste problema são a falta de aderência ao tratamento, prescrições iniciais inadequadas, erros clínicos, a demora do diagnóstico e também a não implementação de programas de controlo e vigilância. De todas estas, a falta de aderência ao tratamento é a causa mais frequente de insucesso terapêutico nesta doença. Responsáveis por este facto são as más condições sócio – económicas, distúrbios emocionais e comportamentais, baixo nível educacional, toxicodpendência, alcoolismo, imigrados, desalojados, entre outros (WHO Guideline, 1997; Chan e Iseman, 2002; WHO Guideline, 2003).

A toma inadequada da medicação leva à supressão de crescimento dos bacilos sensíveis, mas permite a multiplicação dos resistentes (WHO Guideline, 2003). A prevalência da tuberculose multirresistente, em novos casos, aumenta dez vezes mais depois de um tratamento mal sucedido. A prescrição adequada dos fármacos utilizados é o ponto de partida para a prevenção deste problema (Coker, 2004). Os indivíduos que desenvolvem infecção por estirpes resistentes, nomeadamente TBMR, apresentam grandes cavidades nos órgãos afectados e graves lesões crónicas onde é difícil a penetração dos medicamentos. O ajuste da terapêutica geralmente consiste no aumento da dose das drogas

de 1ª linha ou substituição por fármacos de 2ª linha (Mukherjee, 2004). A resistência adquirida define-se como a resistência do microorganismo responsável pela infecção a pelo menos uma droga anti-TB. Pode surgir durante ou depois do curso do tratamento, geralmente como resultado da não adesão ao esquema terapêutico recomendado ou à prescrição incorrecta ou inadequada do antibiótico. A existência elevada deste tipo de resistências é uma grande preocupação e o facto fundamental dos programas de controlo da TB (WHO Guideline, 2003). Existem situações em que se verificam resistências a mais do que um antibacilar. Designa-se por monorresistentes as estirpes que desenvolveram resistências a uma só droga e polirresistentes aquelas que desenvolveram resistências a mais que um fármaco. Para além da gravidade clínica e epidemiológica, esta situação tem também um grave impacto económico. O tratamento é muito mais caro e torna-se difícil fazer o ajuste da terapêutica adequada, diminuindo a possibilidade de sucesso e de cura com consequente aumento da possibilidade de contágio da comunidade envolvente (WHO Guideline, 2003).

### 1.5. Diagnóstico

#### 1.5.1 Diagnóstico clínico

Os doentes com tuberculose pulmonar apresentam sinais e sintomas pouco específicos como tosse, expectoração, febre, emagrecimento, astenia, anorexia e dor torácica. Nas outras formas de expressão da doença, dependendo da localização da infecção, é necessário valorizar a presença de sintomatologia esofágica, insuficiência renal, abscesso rectal, fissuras perianais, obstrução da veia cava superior, conjuntivites, alterações hematológicas entre outras.

Os métodos imagiológicos ajudam a apontar na direcção da doença. Por exemplo, na tuberculose pulmonar, um raio X aos pulmões permite a observação de lesões características. Para além da observação macroscópica das lesões, também é possível o estudo anatómico-patológico do tecido afectado verificando-se alterações típicas como a presença de granulomas.

A prova da tuberculina utiliza-se como meio auxiliar de diagnóstico, em conjunto com os dados clínicos e radiológicos. Consiste na injeção intradérmica de uma solução que contém uma fração de proteína tuberculínica purificada, obtida a partir de uma cultura de bacilos da tuberculose. Esta metodologia é pouco sensível, visto que febre ou diminuição da imunidade celular, entre outras causas, podem levar uma prova falsamente negativa. Também é pouco específica, sendo que em casos de infecção por uma outra espécie de micobactérias podem obter-se resultados positivos. Contudo, a prova tuberculínica tem um papel importante no rastreio da infecção.

Apesar da existência de dados clínicos sugestivos de tuberculose, para um diagnóstico definitivo, é necessário proceder ao isolamento e caracterização do microorganismo responsável pela infecção.

### 1.5.2 Diagnóstico Laboratorial

*M. tuberculosis* foi descoberto há mais de 100 anos e Koch demonstrou a técnica de cultivo em 1882. Em 1920 surgiu o meio de *Lowenstein – Jensen* e só a partir de 1980 é que começam a ser implementadas novas e variadas técnicas de diagnóstico.

Na tuberculose pulmonar o *M. tuberculosis* pode ser isolado, a partir de produtos de origem pulmonar, como a expectoração, lavado brônquico, lavado bronqueo-alveolar, biópsia brônquica ou suco gástrico. Nos casos de tuberculose extra-pulmonar pode detectar-se a presença de bacilos em produtos biológicos como urina, fezes, sangue, líquido céfalo-raquídeo, biópsias ósseas ou qualquer outro fluido, tecido ou órgão (Koneman *et al.*, 1997).

A amostra a analisar deve ser colhida para recipientes estéreis e estanques, enviados urgentemente ao laboratório (WHO Guideline, 2003). As amostras clínicas que contêm microorganismos constituintes da flora local ou adquirida durante a colheita, necessitam de ser processadas de forma a inibir o crescimento destes contaminantes. Líquido céfalo – raquídeo, líquido sinovial, fragmentos hepáticos, entre outros, geralmente não contêm flora associada, não sendo necessário submeterem-se a um processo de descontaminação. A elevada quantidade de lípidos presente na parede celular do *M. tuberculosis* torna-o mais resistente a ácidos fortes e soluções alcalinas do que outras bactérias que possam estar

presentes na amostra clínica. Assim, sempre que necessário, os produtos biológicos são tratados com agentes descontaminantes, durante um período de tempo controlado, que não só destroiem a flora indesejada, como, fluidificam as mucosidades onde os bacilos possam estar alojados (Koneman *et al.*, 1997). Após homogeneização e descontaminação procede-se à realização de um esfregaço para observação microscópica (exame directo) e à sementeira do produto em meios de cultura adequados (exame cultural).

Para o crescimento de *M. tuberculosis* utilizam-se meios de cultura que permitam o desenvolvimento de colónias características a partir de inóculos pobres e que reduzam a taxa de contaminação. O meio de *Lowenstein – Jensen* é ainda hoje dos mais utilizados para este fim (WHO Guideline, 1997; WHO Guideline, 2003). Neste meio, é possível obter culturas positivas entre a 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana de incubação.

Existem métodos de diagnóstico mais rápidos como o Sistema Bactec (Becton Dickinson), que utiliza meios líquidos para a cultura do produto biológico, permitindo o diagnóstico em duas semanas (Wilson *et al.*, 1999; Ramachadran e Paramasivan, 2002; Drodniowski *et al.*, 2004). A partir de uma cultura positiva procede-se à identificação da espécie de micobactérias e determinação do perfil de sensibilidade aos antibacilares. A identificação é realizada por provas bioquímicas ou métodos biomoleculares (sondas de DNA, por exemplo).

Estão a ser implementadas nos laboratórios técnicas de diagnóstico serológico que consistem na pesquisa, em produtos biológicos, de anticorpos específicos para determinados antígenos do *M. tuberculosis*. Porém, estes métodos ainda não permitem chegar um diagnóstico definitivo.

Nos laboratórios de diagnóstico devem ser usadas técnicas rápidas, sensíveis e específicas que conduzam rapidamente ao isolamento, à identificação do microorganismo e determinação do seu perfil susceptibilidade às drogas. A diminuição do tempo de espera do diagnóstico de certeza permite ao doente ser rapidamente submetido a um tratamento adequado, reduzindo a probabilidade de propagação da doença. Mais ainda, sempre que um doente esteja infectado por outra micobactéria que não *M. tuberculosis* diminui-se o tempo de isolamento em salas específicas e procede-se à alteração do esquema terapêutico (Drodniowski *et al.*, 2004).

### 1.5.3 Testes de sensibilidade a drogas

A avaliação da sensibilidade aos fármacos para o *M. tuberculosis* pode ter três objectivos: (i) escolher o esquema terapêutico no início do tratamento, (ii) avaliar se há desenvolvimento de resistência aos fármacos quando o doente não apresenta resposta ao tratamento, podendo ajudar na escolha de tratamentos alternativos, e (iii) estimar a prevalência da resistência primária ou adquirida na comunidade. O teste de sensibilidade deve ser feito a partir da estirpe obtida no primeiro isolamento de cada doente, ou seja, em todos os casos novos, e deve ser repetido se o doente continuar com culturas positivas após três ou mais meses de tratamento, ou se depois de um período de culturas negativas houver o aparecimento de culturas positivas (WHO Guideline, 1997; Chan e Iseman, 2002).

Os testes fenotípicos permitem determinar o perfil de sensibilidade das estirpes em estudo relativamente às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose. Para este fim, existem três métodos padronizados. O método das concentrações absolutas consiste na determinação da concentração mínima inibitória (CMI), isto é, a mais baixa concentração de droga que consegue inibir o crescimento de um inóculo padronizado (WHO Guideline, 1997). O método da razão de resistência, que é uma variante do método descrito anteriormente e consiste em comparar o CMI da estirpe a testar com o CMI de uma estirpe padrão sensível. Existem ainda, o método das proporções e suas variantes, em que a partir de um inóculo padronizado são feitas diluições e semeadas quantidades exactas no meio de cultura sem fármaco e no meio com uma determinada concentração de antibiótico. A avaliação dos resultados é feita por detecção da presença ou ausência de colónias no meio contendo a concentração crítica do fármaco (Koneman *et al.*, 1997; Ramachandran e Paramasivan, 2002). De acordo com o critério de resistência adoptado, considera-se resistente uma estirpe em que a percentagem de colónias que se desenvolva em presença da concentração crítica do fármaco é superior ou igual a 1% e sensível se a percentagem é inferior a 1%. A concentração crítica das drogas a testar foi adoptada por uma convenção internacional e representa a mais baixa concentração de droga que inibe 95% das estirpes selvagens de *M. tuberculosis* (nunca expostas a drogas). Simultaneamente, não inibe as estirpes de *M. tuberculosis* isoladas de doentes que não responderam ao tratamento e que por isso, são consideradas resistentes (Woods *et al.*, 2003).

O método das proporções em meio sólido, geralmente em meio de Lowenstein – Jensen ou meio gelosado de Middlebrook 7H10, é o método de eleição para a determinação da resistência a drogas. O período necessário para avaliar os resultados nestes meios sólidos é longo, pois a primeira leitura faz-se ao 28º dia e a confirmação dos resultados realiza-se ao 42º dia. No sentido de obviar esta demora, têm vindo a ser introduzidos sistemas comerciais mais rápidos, que utilizam meios de cultura líquidos e que se baseiam no método das proporções podendo ser aplicado a diferentes meios de detecção como o sistema radiométrico Bactec 460 (Becton Dickinson) e não radiométrico Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson). Os resultados com estes sistemas são validados entre o quinto e o décimo terceiro dia (Koneman *et al.*, 1997; Ramachandran e Paramasivan, 2002).

Os métodos anteriormente descritos são geralmente aplicados a isolamentos clínicos e designam-se por indirectos. Nestes, a avaliação da sensibilidade aos fármacos é feita após a obtenção de culturas puras. Têm como desvantagem o tempo que uma estirpe demora a crescer até à obtenção do seu isolamento (Ramachandran e Paramasivan, 2002; WHO Guideline, 2003). No entanto, também é possível a aplicação dos métodos de avaliação de sensibilidade às drogas directamente à amostra clínica – métodos directos (Viedma, 2003). Considera-se que este método tem algumas vantagens relativamente ao método indirecto. Obtém-se resultados em menos tempo, não é necessário esperar pelo isolamento da estirpe e o inóculo em estudo é mais representativo da população original de micobactérias presente na amostra clínica. Contudo, deve aplicar-se preferencialmente em produtos biológicos com elevado número de bacilos, sendo o ponto decisivo a observação microscópica do esfregaço (Ramachandran e Paramasivan, 2002; WHO Guideline, 2003). A demora na obtenção de resultados dos testes de sensibilidade a drogas, agravado pelo surgimento de estirpes resistentes, aumentou a necessidade de obtenção de resultados rápidos, o que levou ao desenvolvimento de métodos genotípicos. Estes consistem na análise directa do DNA, permitindo identificar a mutação responsável pelo desenvolvimento de resistência (Viedma, 2003).

O *M. tuberculosis* adquire resistência a drogas por ocorrência de mutações nos genes que codificam os alvos do fármaco. Na tabela 1.2 estão referidos alguns antibacilares utilizados no tratamento da tuberculose, os seus mecanismos de acção, os genes envolvidos

e respectivas funções (Somoskovi *et al.*, 2001; Ramachandran e Paramasivan, 2002; Viedma, 2003).

Actualmente existe uma variedade de métodos moleculares baseados na reacção em cadeia da polimerase (PCR) que permitem amplificar especificamente apenas determinadas regiões dos genes envolvidos na resistência, para posterior detecção de mutações que conferem resistências. A análise das sequências de nucleótidos, para identificação da presença de mutações, tem sido feita por metodologias que incluem a sequenciação do DNA, análises de fragmentos de DNA gerados com enzimas de restrição (RFLP), avaliação de polimorfismo conformacional de fragmentos de cadeia simples (SSCP), entre outros (Cingolani *et al.*, 1999; Niemann *et al.*, 2000; Sachan *et al.*, 2002; Mackay *et al.*, 2002; Mokrousov *et al.*, 2003). A sequenciação de produtos de PCR é a principal técnica usada para elucidar os mecanismos de resistência aos fármacos em *M. tuberculosis*, permite detectar mutações já descritas e identificar novas mutações, porém não é uma metodologia utilizada em rotina. As técnicas de SSCP e RFLP têm sido usadas com mais frequência em rotina laboratorial, no entanto, apenas identificam a resistência aos fármacos sem caracterizar a mutação.

Existem ainda técnicas de PCR em tempo real (PCR-tr), baseiam-se no mesmo fundamento teórico que as técnicas de PCR convencional, distinguindo-se pela possibilidade de acompanhar a reacção de amplificação desde o seu início. Estas técnicas são dispendiosas e por isso não são suportados por qualquer tipo de laboratório. Além disto, necessitam de pessoal especializado devido à existência de complexos aparelhos de PCR (Ramaswamy e Musser, 1998; Viedma, 2003).

**Tabela 1.2** - Genes de *M. tuberculosis* que quando sofrem determinadas mutações conferem resistência a drogas usadas no tratamento da tuberculose (Adaptado de Rossetti *et al.*, 2002).

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de Acção</b>	<b>Genes envolvidos</b>	<b>Função</b>
Isoniazida	Inibição da biossíntese de ácidos micólicos	<i>katG</i> <i>inhA</i> <i>kasA</i> <i>ahpC</i> <i>oxyR</i>	Conversão da pró-droga Alvo fármaco Alvo fármaco Regulador stress oxidativo Regulador stress oxidativo
Rifampicina	Inibição da transcrição	<i>rpoB</i>	Alvo fármaco
Pirazinamida	Inibição da síntese de ácidos gordos	<i>pncA</i> <i>fasA</i>	Conversão da pró-droga Alvo fármaco?
Etambutol	Inibição da síntese de arabinogalactan	<i>embCAB</i>	Alvo fármaco
Estreptomicina	Inibição da síntese protéica	<i>rpsL</i> <i>rrs(16sRNA)</i>	Alvo fármaco Alvo fármaco

#### 1.5.4 Técnicas de PCR em Tempo Real

As técnicas de PCR-tr permitem a análise imediata dos resultados devido à acumulação de fluorescência dos produtos do PCR durante a amplificação, não sendo necessária a sua manipulação pós-PCR. Podem ser usados diferentes formatos de reacção que permitam monitorizar a formação dos produtos, assim como identificar a presença de mutações (Ramaswamy e Musser, 1998; Viedma, 2003). Relativamente ao PCR convencional, as técnicas de PCR-tr são mais rápidas, sensíveis, reprodutíveis e reduzem o risco de contaminações pós-amplificação.

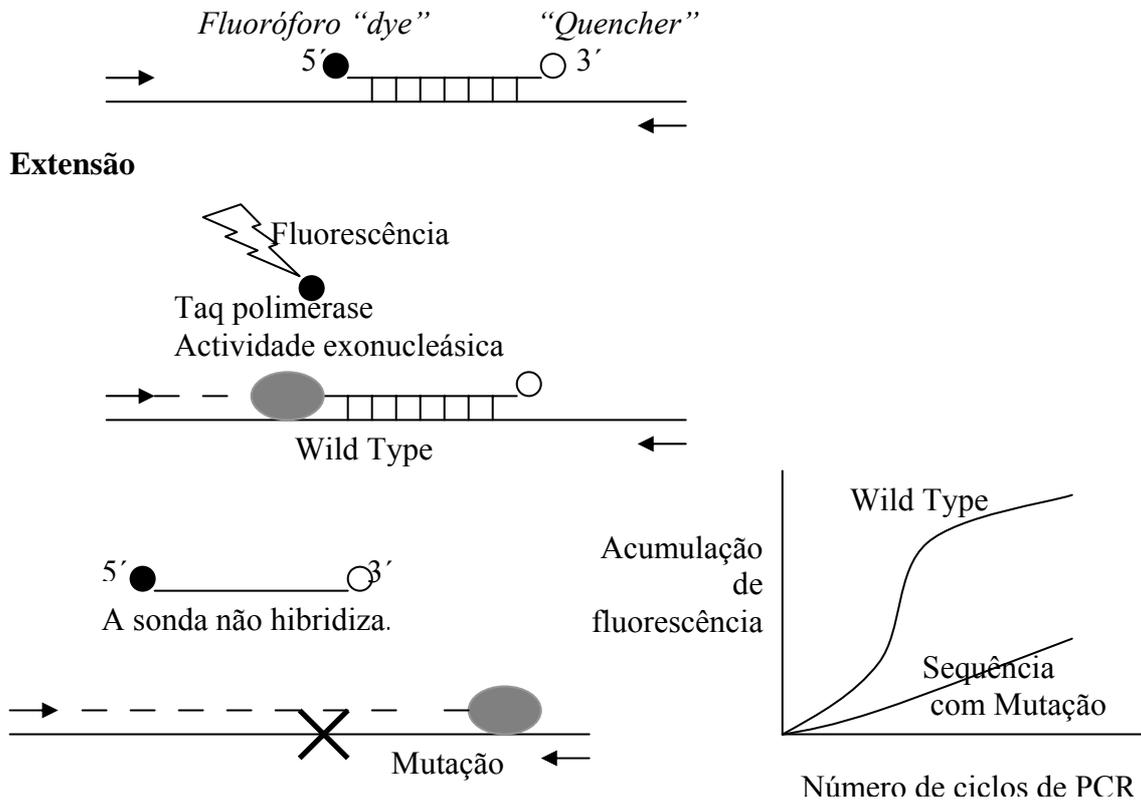
A monitorização da acumulação de DNA amplificado é possível recorrendo a moléculas fluorogénias ou sondas de DNA (Mackay *et al.*, 2002). As moléculas fluorogénias intercalam-se na cadeia dupla de DNA em formação permitindo a detecção do produto de PCR. São económicas e não é necessário o desenho de sondas, mas podem

detectar sequências de DNA não específicas. As moléculas mais utilizadas são “SYBRGreen I” (Vamdesompele *et al.*, 2002; Ponchel *et al.*, 2003; Marino *et al.*, 2003).

Para a detecção de produtos de PCR específicos utilizam-se pequenas sequências de nucleótidos complementares a uma determinada zona do fragmento amplificado e são marcadas com um fluoróforo. Esses oligonucleótidos podem ser “*primers*” ou sondas, lineares ou em alça (“*hairpin*”). Estão descritos vários tipos de sondas, sendo as mais referidas as sondas “*TaqMan*”, as sondas “*molecular beacons*” e as sondas “*FRET*” (Viedma, 2003; Mackay *et al.*, 2002).

As sondas “*TaqMan*” são sequências de nucleótidos lineares marcadas na extremidade 5’ com um fluoróforo (“*dye*”) e na extremidade 3’ com uma molécula captadora de fluorescência (“*quencher*”). Na fase de hibridização do PCR, as sondas ligam-se à sequência alvo com a qual apresentam total complementaridade. Nesta fase, não se regista fluorescência porque o “*quencher*” absorve a energia do “*dye*”. Na fase de amplificação, a *Taq* polimerase, devido à sua actividade 5’-3’ exonucleásica, degrada a sonda hibridizada e “liberta” o “*dye*”. Este torna-se fluorescente ao afastar-se do “*quencher*”, como podemos ver no esquema da Figura 1.2. Só é emitida fluorescência quando existe total complementaridade entre a sonda e a sequência alvo. Vários autores desenvolveram estudos para detecção e identificação de mutações, utilizando sondas “*TaqMan*”, em estirpes resistentes à INH e RPM, tendo obtido 100% de especificidade (Ponchel *et al.*, 2003; Viedma, 2003), 97% de sensibilidade para a RPM e 40% de sensibilidade para a INH (Ponchel *et al.*, 2003; Viedma, 2003).

## Hibridização

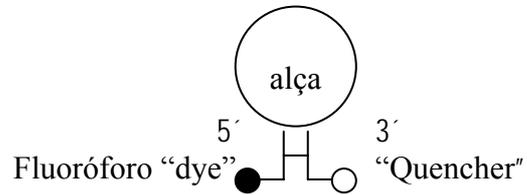
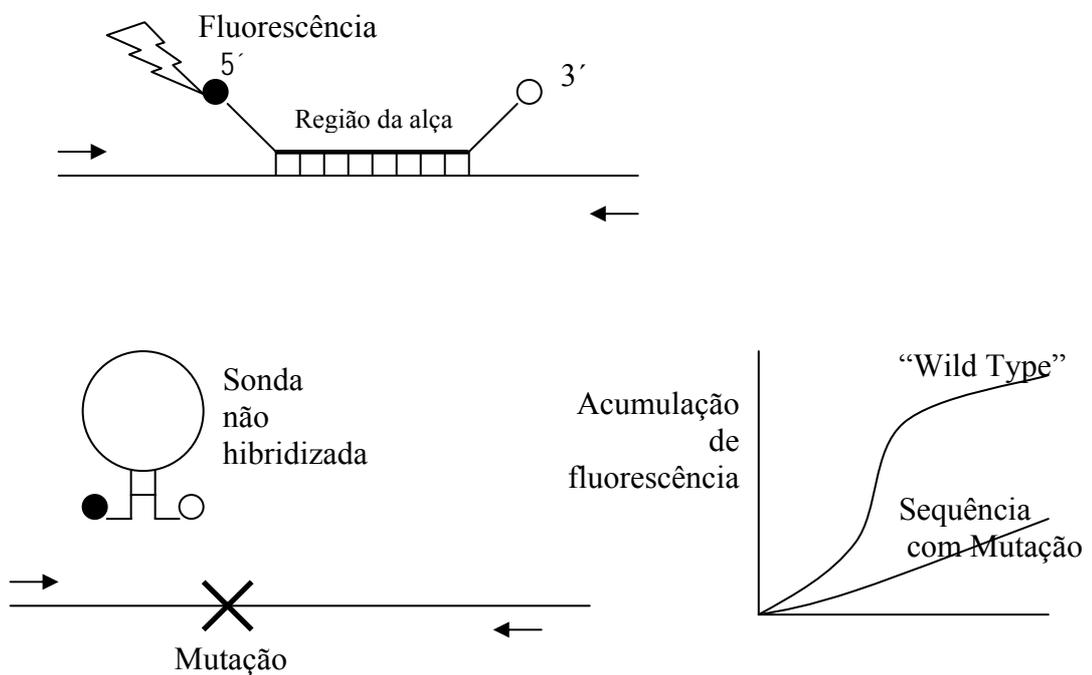


As sondas hibridizam com a sequência alvo, não se registando fluorescência porque o "quencher" absorve a energia do fluoróforo "dye". Na fase de amplificação, a *Taq* polimerase devido à sua actividade 5'-3' exonucleásica "liberta" o fluoróforo "dye" que se torna fluorescente ao afastar-se do "quencher". Quando não existe total complementaridade entre a sonda e a sequência de DNA não ocorre hibridização, não se verificando a emissão de fluorescência.

**Figura 1.2** - Esquema do mecanismo de acção das sondas "TaqMan" (adaptado de Viedma, 2003).

As sondas “*molecular beacons*” são sequências de DNA com um formato em alça, em que os últimos nucleótidos das extremidades 5’ e 3’ são complementares entre si e hibridizam. A sequência de nucleótidos que constitui a alça é complementar à sequência que se pretende identificar. Em cada extremidade 5’ e 3’ existe um fluoróforo, o “*dye*” e o “*quencher*” respectivamente. Mantendo a sua estrutura em alça, estes fluoróforos estão extremamente próximos, não havendo emissão de fluorescência. Durante a fase de hibridização e na presença de sequências de DNA complementares à sonda, esta lineariza e hibridiza com o alvo. Assim os fluoróforos ficam afastados havendo emissão de fluorescência pelo “*dye*” localizado na extremidade 5’ da sonda. Este mecanismo está representado na Figura 1.3. Existem estudos que descrevem a utilização destas sondas para a detecção e identificação de mutações responsáveis pela resistência à rifampicina (Piatek *et al.*, 1998; Bonnet *et al.*, 1999; Piatek *et al.*, 2000; Viedma, 2003).

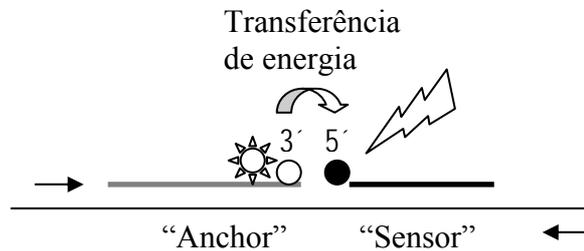
As sondas “FRET” são pares de oligonucleotídeos em que a primeira sonda está marcada com um fluoróforo “*anchor*” na extremidade 3’ e a sonda adjacente possui um fluoróforo “*dye*” na extremidade 5’. Ao hibridizarem com a sequência complementar e apresentando-se de 5’ para 3’, o “*anchor*” transfere energia ao “*dye*”, que por sua vez emite fluorescência (Viedma, 2003). Este tipo de sondas permite a realização de curvas de “*melting*” no final do PCR. Estas curvas consistem num aumento lento da temperatura (0,05 – 0,2°C por segundo) que leva à desibridização das sondas quando a sua temperatura de “*melting*” é atingida, com consequente redução de emissão de fluorescência (Kaps *et al.*, 2001; Helps *et al.*, 2002). A temperatura de “*melting*” é constante e característica de cada par de sondas que hibridiza com a sequência “*wild type*”. Na presença de mutações, a complementaridade entre as sondas e sequência alvo não é absoluta, pelo que, a temperatura de “*melting*” decresce, permitindo a detecção e identificação da mutação. Na Figura 1.4 está representado o mecanismo das sondas “FRET”. Diferentes autores descrevem a utilização destas sondas na detecção e identificação de resistências à RPM e INH (Tan *et al.*, 2000; Kaps *et al.*, 2001; Viedma *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003; Sajduda *et al.*, 2004).

**Estrutura da sonda****"Annealing"**

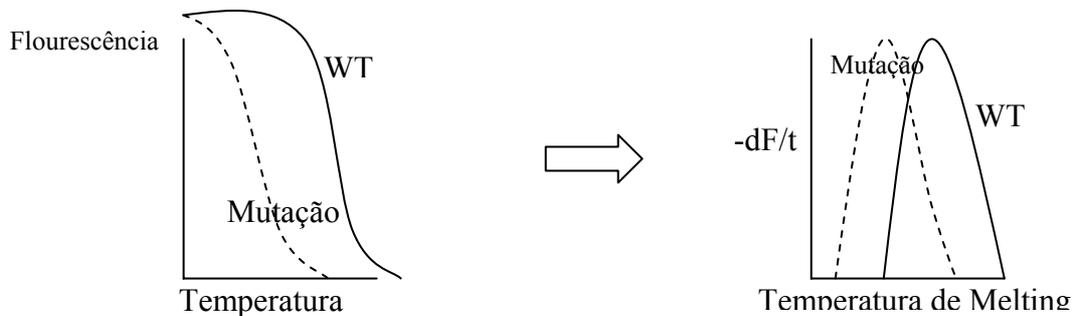
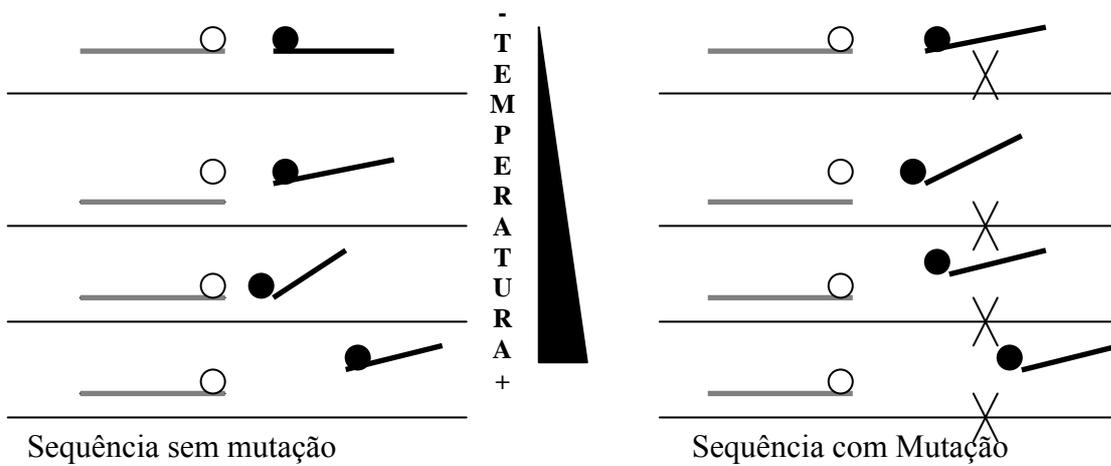
As sondas "*molecular beacons*" são sequências de DNA em que os últimos nucleótidos das extremidade 5' e 3' hibridizam entre si. Na presença de uma sequência totalmente complementar, a sonda abre e hibridiza com o DNA alvo, verificando-se a emissão de fluorescência. Quando não existe total complementaridade não ocorre hibridização, não se verificando a emissão de fluorescência.

**Figura 1.3** - Esquema do mecanismo de ação das sondas "*molecular beacons*" (adaptado de Viedma, 2003).

“Annealing”



Pós PCR – Curva de “melting”



As sondas FRET são pares de oligonucleotidos que apresentando-se de 5’para 3’, a primeira sonda está marcada com o fluoróforo “*anchor*” na extremidade 3’ e a sonda adjacente possui um fluoróforo “*dye*” na extremidade 5’. O “*anchor*” transfere energia ao *dye* e este emite fluoreescência. Esta transferência de energia só ocorre quando existe uma distância de 1 a 5 nucleótidos entre as duas sondas. Estas permitem a realização de curvas de “*melting*”, no final do PCR. A temperatura de “*melting*” é constante para um par de sondas que hibridizam com a sequência “*wild type*”, apresentando diferenças na presença de mutações, permitindo a sua identificação.

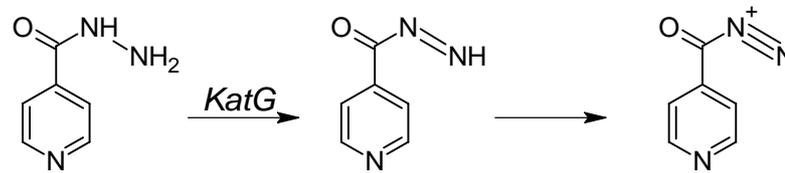
**Figura 1.4** - Esquema do mecanismo de acção das sondas “FRET” (adaptado de Viedma, 2003).

### 1.6. Mecanismo de acção da isoniazida

A INH foi sintetizada pela primeira vez em 1912, numa Universidade Alemã, por Meyer e Mally, tendo sido redescoberta em 1952 por outros laboratórios na Alemanha, Suíça e Estados Unidos. Desde então, tem desempenhado um papel muito importante na terapêutica e profilaxia da tuberculose, sendo um dos antibióticos de 1ª linha receitados e administrados em todo o mundo. É um fármaco sintético, derivado pirimídico, considerando-se a hidrazida do ácido isonicotínico. Apresenta uma potente acção antibacteriana sobre o *M. tuberculosis*, sendo também activo sobre o *M. bovis* e o *M. africanum*. Contudo, não apresenta actividade contra outras micobactérias ou outros patogéneos eucariotas.

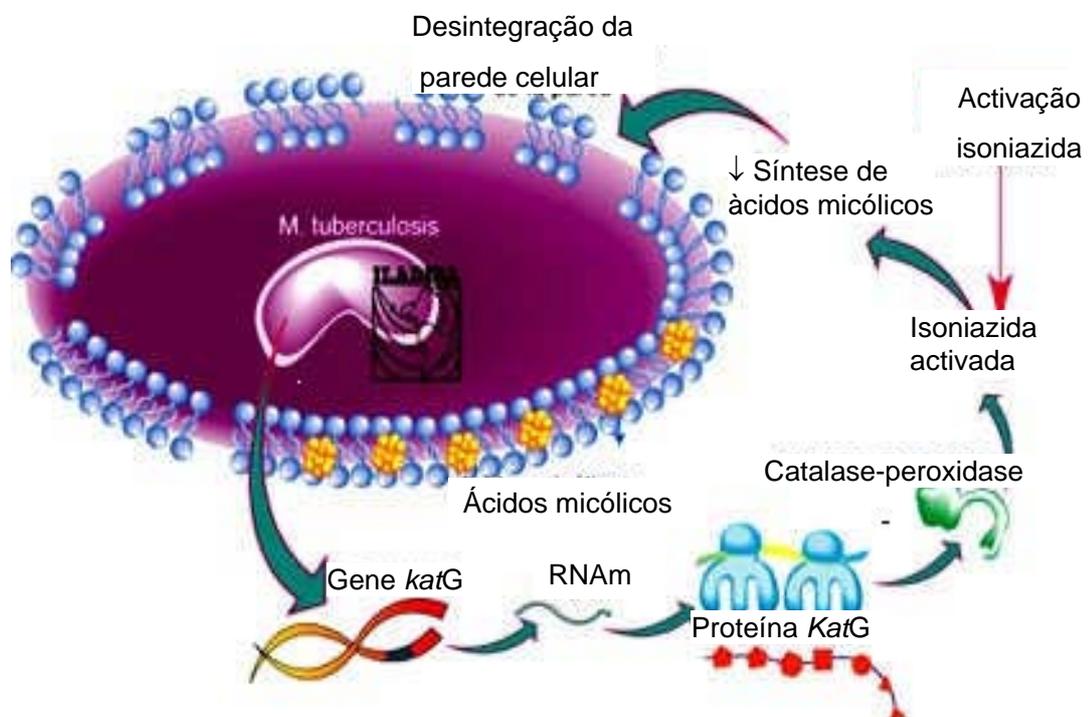
*In vitro*, verifica-se que a INH entra na célula micobacteriana por difusão passiva através da parede celular. Este fármaco é uma pró-droga que requer ser activado pela catalase–peroxidase (*KatG*) do bacilo. A *KatG* promove a remoção de dois electrões da isoniazida tornando-a num intermediário activo, como está representado na Figura 1.5 (Wengenack e Rusnak, 2001; Whitney e Wainberg, 2002). A forma activa da droga inibe a actividade das proteínas enoil-(transportadora de acil) reductase (*InhA*) e a proteína  $\beta$ -cetoacil-(transportadora de acil) sintetase (*KasA*), que participam na síntese dos ácidos micólicos (Rattan *et al.*, 1998). Mais especificamente, a proteína *InhA* estabelece uma ligação no seu local activo com o NAD(H), utilizando-o como cofactor. Por sua vez, a INH activada liga-se covalentemente com o carbono 4 do NADH, do complexo *InhA*-NADH, na presença de oxigénio e manganésio (Johnsson *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2003), ocorrendo a inibição da síntese de ácidos micólicos.

As duas proteínas anteriormente referidas participam na síntese de ácidos micólicos necessários à formação de ácidos gordos de longa cadeia, constituintes da parede celular micobacteriana. Deste modo, são potenciais alvos para a acção da forma activada da droga no *M. tuberculosis*, levando à desintegração da parede celular e morte do microorganismo, como se pode ver na Figura 1.6.



**Figura 1.5** – Mecanismo de activação da isoniazida pela *KatG*.

A *KatG* promove a transferência de dois electrões da droga inactiva transformando-a numa forma activa (Adaptado de Whitney *et al.*, 2002).



**Figura 1.6** – Mecanismo de acção da isoniazida (Adaptado de [www.iladiba.com](http://www.iladiba.com)).

### 1.7. Características da catalase peroxidase

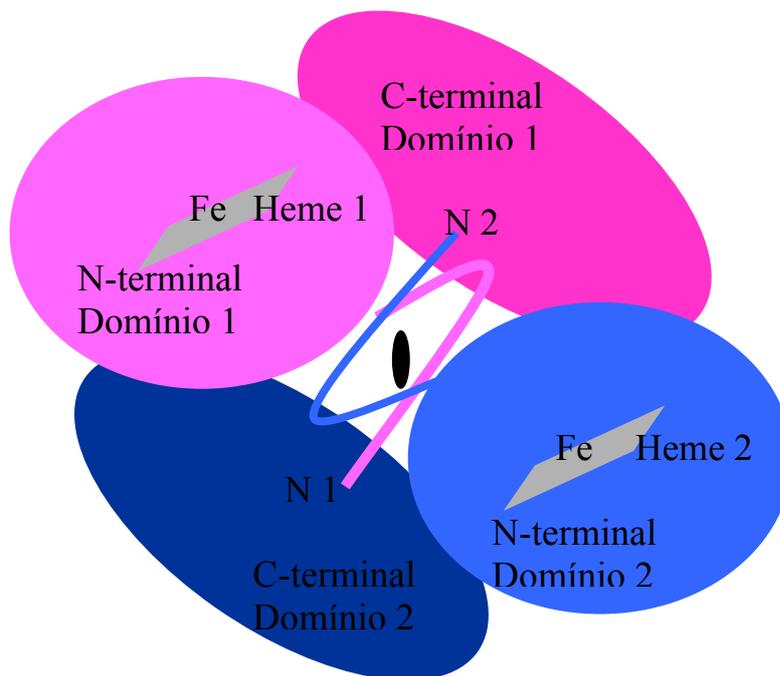
As catalases-peroxidases são enzimas bifuncionais, heme dependente de ferro, que apresentam elevada actividade catalítica, quando comparadas com catalases monofuncionais, e um largo espectro de actividade peroxidásica. Convertem  $H_2O_2$  em radicais  $O_2$  e  $H_2O$  através da actividade da catalase e, por outro lado, a peroxidase consegue formar moléculas de  $H_2O_2$ , o que acontece no mecanismo de activação da INH (Cardona *et al.*, 2003; DeVito e Morris, 2003; Bertrand *et al.*, 2004). A função essencial da enzima é proteger a micobactéria de moléculas tóxicas como hidroperóxidos e radicais hidróxilos provenientes do seu metabolismo celular e de agressões externas.

As catalases-peroxidases são geralmente homodímeros ou homotetrameros compostas por subunidades de 80kDa. As cadeias simples de polipeptídeos contém dois domínios com aproximadamente 40 quilodaltons (kDa) cada. Estudos de sequenciação demonstram que o domínio N-terminal é o local de ligação do grupo heme, não apresentando o C-terminal as mesmas características (Bertrand *et al.*, 2004).

O estudo da estrutura por cristalização demonstra que a *KatG* do *M. tuberculosis* é um homodímero funcional (Figura 1.7). O mapa de densidades electrónicas mostra que cada monómero inclui 24 a 740 resíduos na cadeia polipeptídica, um grupo heme e três moléculas de glicerol. Verificou-se também a existência de 703 moléculas de água associadas com o homodímero. Cada monómero é constituído por dois domínios apresentando uma estrutura em  $\alpha$  - hélice. O domínio N-terminal contém o local activo da enzima, que inclui o grupo heme b prostético. O domínio C-terminal é semelhante ao N-terminal e resulta da duplicação do gene. O grupo heme não se observa neste domínio, apresentando o local de ligação inactivo. A interacção mais importante acontece entre N- e o C-terminal dos domínios dos dois monómeros que formam o homodímero funcional (Bertrand *et al.*, 2004). Outros trabalhos demonstraram a importância do C-terminal dos domínios na estabilidade da interacção subunidade-subunidade (Saint-Joanes *et al.*, 1999).

A enzima *KatG* do *M. tuberculosis* é codificada pelo gene *katG* que possui 2223 pares de bases (pb) e está geneticamente ligado ao gene *furA*, a uma distância de 40 pb (Pym *et al.*, 2001). O *katG* é transcrito a partir de 2 promotores. Uma transcrição inclui os genes *furA* e *katG* e a outra corresponde apenas ao *katG*. Mutações nestes genes podem ser

responsáveis pelo desenvolvimento de resistência à INH. A enzima nativa *KatG* é mais eficiente que as enzimas mutadas, no que se refere à sua actividade catalítica (Wengenack e Rusnak, 2001).



**Figura 1.7** – Estrutura da *KatG* do *M. tuberculosis* (Adaptado de Bertrand *et al.*, 2004).

Estrutura global do homodímero. A subunidade 1 está representada a cor de rosa (o domínio N-terminal é o rosa claro e o C-terminal o rosa escuro). A subunidade 2 está representada a azul (o domínio N-terminal é o azul claro e o C-terminal o azul escuro).

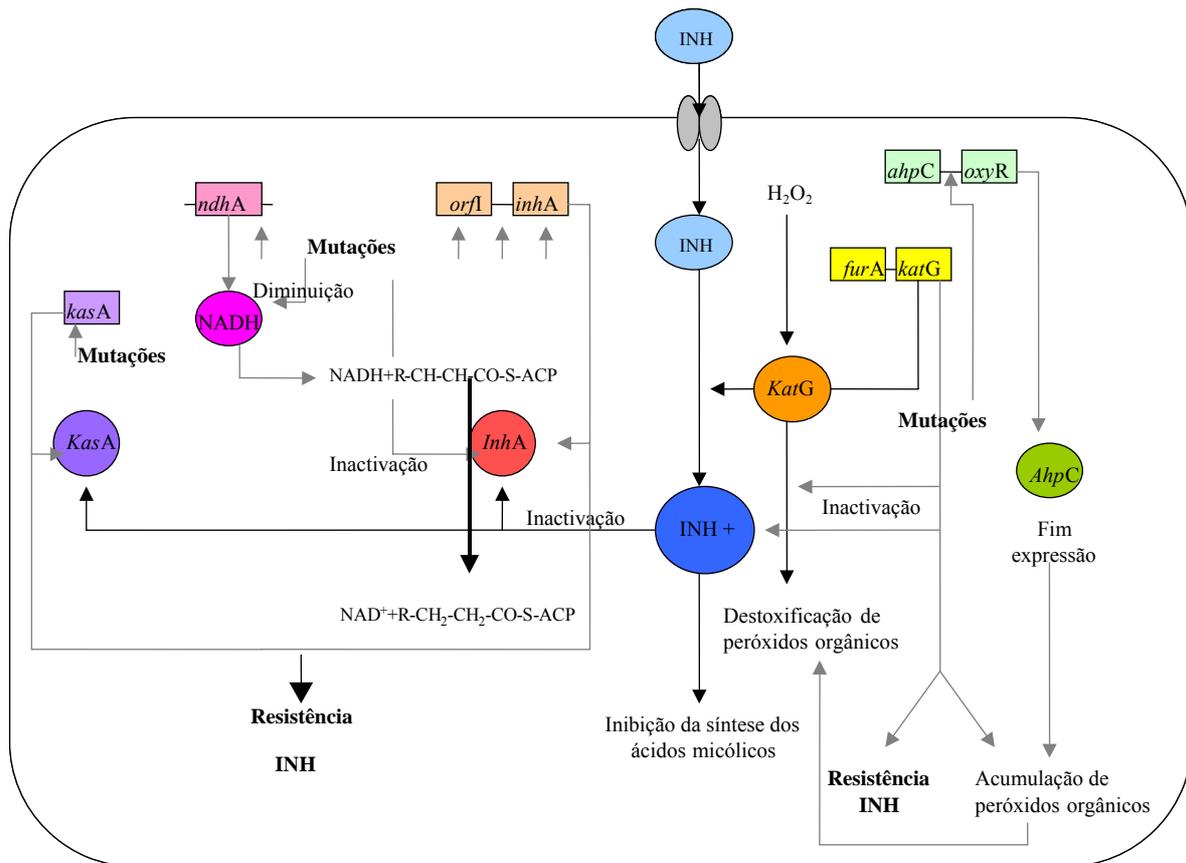
A mutação no codão 315 do gene *katG* ocorre com elevada frequência e está relacionada com elevados níveis de resistência à INH. O resíduo Ser 315 está localizado na periferia do centro activo da enzima e estabelece ligação por pontes de hidrogénio com um dos grupos heme. A substituição da serina por treonina modifica o estabelecimento desta ligação, altera a afinidade para a INH e/ou afecta a transferência de electrões do grupo heme. Mutações em que há substituição para treonina verifica-se a redução de afinidade para a droga, não ocorrendo o bloqueamento do acesso ao local activo. Também as outras substituições de aminoácidos nesta posição podem limitar o acesso ao local de ligação (Saint-Joanes *et al.*, 1999, Bertrand *et al.*, 2004). Existem diferenças fundamentais entre o local activo da *KatG* nativa e *KatG* Ser315Thr. Esta última difere também na capacidade para reconhecer a INH como substrato, existe maior distância entre o local de ligação da INH e o grupo heme, onde está localizado o ferro (Wengenack *et al.*, 1998).

### 1.8. Mecanismo de resistência à INH em estirpes clínicas

O mecanismo de resistência da INH em estirpes clínicas de *M. tuberculosis* é complexo. A ocorrência de mutações em diferentes genes pode estar na sua origem, como está representado na Figura 1.8. A percentagem de mutações descritas que conferem resistência à INH variam de acordo com a área geográfica (Viedma *et al.*, 2002).

A *KatG* é uma proteína cuja actividade permite remover peróxidos orgânicos da célula e é a única enzima capaz de activar a INH. A enzima *KatG* do *M. tuberculosis* é codificada pelo gene *katG* e está geneticamente ligado ao gene *furA* (Pym *et al.*, 2001). Mutações nestes dois genes podem ser responsáveis pela diminuição da actividade da enzima e levar ao desenvolvimento de resistência à INH. No gene *katG* só a mutação no codão 315 ocorre com suficiente frequência. A alteração de bases nem sempre é a mesma, podendo dar origem a aminoácidos diferentes (Ramaswamy e Musser, 1998; Hazbon e Alland, 2004). Estão descritas outras mutações relacionadas com esta resistência. Estatisticamente a substituição de aminoácidos mais comum é AGC (Ser) para ACC (Thr), mas ACA (Thr), ATC (Ile), AGA (Arg), CGC (Arg), AAC (Asp) e GGC (Gly) também foram identificadas (Ramaswamy e Musser, 1998). Outro polimorfismo que aparece

descrito é a mutação no codão 463 do mesmo gene em que se verifica uma alteração de CGG(Arg) para CTG(Leu). Alguns estudos referiam que estas mutações também eram responsáveis pelo desenvolvimento de resistência à INH. Contudo, mais tarde, verificou-se que estirpes com esta alteração apresentavam níveis de actividade de catalase-peroxidase iguais a estirpes sem mutações, e também está presente em muitas estirpes sensíveis a esta droga.



**Figura 1.8** – Esquema representativo do mecanismo de acção e aquisição de resistência da isoniazida (baseado em Rattan *et al.*, 1998).

A INH entra na célula bacteriana por difusão passiva, é activada pela KatG e actua nas proteínas alvo, *InhA* e *KasA*. Mutações nos genes das proteínas que participam neste mecanismo podem levar ao desenvolvimento de resistência à INH.

As proteínas *KatG* 463Arg e *KatG* 463Leu não apresentam diferenças significativas na actividade da catalase ou peroxidase ou noutros parâmetros enzimáticos. Ambas oxidam a INH a ácido isonicotínico, apresentando a mesma dependência relativamente à concentração da droga. Outras mutações que acontecem com pouca frequência também estão descritas como responsáveis pelo desenvolvimento de resistências: Arg104Leu, His108Gln, Asn138Ser, Asn138His, Leu148Arg, His270Gln, Thr275Pro, Ser315Thr, Ser315Asn, Ser315Ile, Ser315Arg, Ser315Gly, Trp321Gly, Trp328Gly, Trp328Leu, Trp328Cys e Asp381Gly (Rouse *et al.*, 1995; Ramaswamy e Musser, 1998). Os aminoácidos 104 e 108 estão localizados no centro catalítico da enzima e os aminoácidos 270, 275 e 315 participam na ligação do grupo heme da proteína (Rouse *et al.*, 1995; Ramaswamy e Musser, 1998).

Em estirpes de *M. tuberculosis* que apresentam um baixo nível de resistência à INH e não apresentavam mutações no gene *katG*, identificaram-se mutações noutros genes.

A proteína *InhA* que participa na síntese dos ácidos micólicos é um alvo da INH. Esta enzima, no seu local activo estabelece ligações com NAD(H) e promove a redução específica da 2-trans-enoil ACP (Proteína transportadora de acil), um passo essencial na alongação de ácidos gordos. A ligação da INH activada com o complexo *InhA*-NAD(H) resulta numa inibição permanente da síntese dos ácidos micólicos. Mutações na zona *orfI*, *inhA* ou na região intergénica destas duas sequências, podem levar a uma diminuição de afinidade da ligação *InhA*-NAD(H)-INH, não se verificando a inibição permanente da síntese de ácidos micólicos (Whitney *et al.*, 2002). Estão descritas as seguintes mutações no gene estrutural *inhA*: Ile16Thr, Ile21Thr, Ile21Val, Ile47Thr, Val78Ala, Ser94Ala e Ile95Pro. Estas mutações resultam na alteração de aminoácidos no local de ligação do NADH à *InhA* (Ramaswamy e Musser, 1998; Ramaswamy *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003). Na zona intergénica também estão descritas mutações que conferem resistência a esta droga (Morlock *et al.*, 2003).

O gene *ndh* codifica a NADH desidrogenase, alterações nesta enzima podem resultar no desequilíbrio da proporção NADH/NAD<sup>+</sup> e no desenvolvimento de resistências à isoniazida. Por outro lado, o NADH é um substrato das peroxidases como a *KatG*. Assim, aumentando as concentrações, pode competir também com a peroxidação da INH. O aumento da concentração de NADH previne a acção do fármaco referido (Miesel *et al.*,

1998; Lee *et al.*, 2001). Neste gene estão descritas as seguintes mutações Thr110Ala e Arg268His (Lee *et al.*, 2001).

A *KasA* é uma proteína que também participa na síntese dos ácidos micólicos, e é inibida pela INH activada. A sua importância clínica, no que diz respeito à resistência à INH em *M. tuberculosis*, ainda necessita de ser esclarecida. Esta enzima é um possível marcador a usar no futuro, relativamente ao desenvolvimento de novas terapêuticas para a TB e também na identificação de resistências à INH (Lee *et al.*, 1999; Ramaswamy *et al.*, 2003). Estudos do gene *kasA*, por sequenciação automática de DNA, verificaram a alteração de 4 aminoácidos em estirpes clínicas resistentes à INH: Arg121Lys, Gly312Ser, Gly387Asp e Gly269Ser. Estas substituições localizam-se no terminal carboxilo da proteína. Nestas estirpes verifica-se também a existência de mutações noutras genes, relacionadas com o desenvolvimento de resistência a esta droga (Lee *et al.*, 1999; Ramaswamy *et al.*, 2003).

O gene *oxyR*, codifica a proteína *OxyR* que apresenta funções de regulador de stress oxidativo, na resposta aos efeitos do metabolismo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e activador da transcrição de genes. Esta proteína controla também a expressão de genes que codificam enzimas com função de detoxificação como a *KatG* e a alquilhidroperoxidase reductase (*AhpC*). Esta última proteína referida está também envolvida na resposta celular ao stress oxidativo (Telenti *et al.*, 1997). Surpreendentemente, o gene *oxyR* é naturalmente inactivado pela acumulação de múltiplas lesões genéticas, incluindo mutações pontuais, deleções, entre outras. Desta forma, torna-o responsável pela sensibilidade de *M. tuberculosis* à INH. A perda de função de *oxyR* resulta na expressão de outros genes cujos produtos estão envolvidos no processo de activação da droga compensado a perda de expressão deste (Sreevatsan *et al.*, 1997; Rinder *et al.*, 1998).

Alterações de nucleótidos na zona promotora do gene *ahpC*, entre o gene *oxyR* e *ahpC*, são identificadas em baixo número, geralmente, em estirpes INH resistentes com baixa actividade de *KatG* (Herrera *et al.*, 2004). Contudo, não estão presentes em estirpes sensíveis a esta droga. Estudos genéticos e bioquímicos demonstram que mutações no *ahpC* resultam da perda de actividade da catalase-peroxidase. A regulação da expressão da proteína alquil –hidroperóxido reductase (*AhpC*) pode participar no desenvolvimento de resistência à INH em estirpes que não apresentam mutações nos genes *katG* e *inhA*. O

mecanismo de resistência para o INH nestes casos ainda não está totalmente descrito. Todavia, o aumento da expressão do *ahpC* leva a uma diminuição da concentração de peróxidos intracelulares (Sreevatsan *et al.*, 1997; Miesel *et al.*, 1998; Rinder *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2003).

Na totalidade, a percentagem de mutações descritas que conferem resistência à INH variam de acordo com a área geográfica. Deste modo, entre 30% a 90% das estirpes possuem mutações no codão 315 do gene *katG* (Viedma *et al.*, 2002). Destas, 15% a 25%, apresentam também mutações no gene *inhA* (Ramaswamy e Musser, 1998). Mutações no último gene referido estão descritas com uma percentagem total de ocorrência que pode cercar os 32%. Um baixo número de estirpes não apresenta alterações nestes dois genes (Rouse *et al.*, 1995).

Mutações noutras zonas genómicas, como o promotor do gene *ahpC* e *kasA*, estão descritas com baixa percentagem de ocorrência. Contudo, alguns trabalhos referem percentagens de 12-24% e 10 a 14%, respectivamente (Ramaswamy e Musser, 1998).

Em cerca de 5 a 15% das estirpes não se conhece o motivo pelo qual desenvolveu resistência a esta droga. Por outro lado, estudos de sequenciação dos genes revelam alguma dificuldade em estabelecer associações estatisticamente válidas entre alguns polimorfismos de um só nucleótido e a resistência ao fármaco (Sreevatsan *et al.*, 1997).

### 1.9. Objectivos da tese

A TB é, sem dúvida, um grave problema de saúde pública que afecta todo o globo terrestre. As vias de transmissão são inter-individuais, as formas clínicas da doença são diversas, a elaboração do diagnóstico definitivo é moroso e o tratamento é prolongado, o que em conjunto dificulta o controlo da doença. O surgimento de estirpes resistentes aos fármacos utilizados no tratamento da TB é preocupante porque contribui para o agravamento do problema. Por este motivo, é urgente a implementação de técnicas rápidas e fiáveis de detecção de resistência às drogas.

O Centro de Tuberculose e Micobactérias do INSA - Porto têm vindo ao longo dos anos a desenvolver projectos de investigação na área de diagnóstico, avaliação da

resistência às drogas e realização de estudos epidemiológicos relacionados com esta área. Um dos trabalhos que estamos a executar neste momento tem como objectivo tipar as mutações genéticas responsáveis pelo desenvolvimento da resistência à INH, RPM e EMB e, simultaneamente, desenvolver uma metodologia que nos permita detectar rapidamente essas mesmas mutações.

O trabalho prático desenvolvido para a elaboração desta dissertação tem como objectivos: (i) a detecção da resistência à isoniazida em estirpes clínicas de *M. tuberculosis*, por ser a mutação no codão 315 do gene *katG* que ocorre com elevada frequência, foi implementada uma técnica que permite a sua detecção por PCR em tempo real, (ii) a caracterização das estirpes resistentes à INH enviadas a este laboratório e (iii) a aplicação da técnica anteriormente referida a DNA extraído de lâminas de exames directos positivos.

Para a execução da metodologia procedeu-se a extracção e quantificação de DNA genómico das estirpes clínicas, provenientes de todo o país que apresentavam resistências à droga referida pelos métodos fenotípicos utilizados no laboratório, e de lâminas de exames directos positivos. De seguida, procedeu-se à amplificação de ácidos nucleicos.

A obtenção de resultados fiáveis permitirá a aplicação desta técnica na análise das estirpes que chegam ao laboratório vindas de todo o país.

---

## 2. Procedimento Experimental



### 2.1. Reagentes

#### **BDH**

Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (para análise [PA]) (Cat.nº 10093)

Dodecil hidrogenosulfato, sal sódico (SDS) (PA) (Cat.nº 30175)

#### **Bio-Rad**

*iQ<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup> Green Supermix* (Cat.nº 170-8880)

#### **Gibco**

Água destilada (grau de biologia molecular [GBM]) (Cat.nº 10977-015)

#### **Merck**

Etanol (GBM) (Cat.nº 1.08543.0250)

Cloreto de Sódio (PA) (Cat.nº 1.06404.1000)

#### **Molecular Probes**

Pico Green dsDNA Quantification Reagents and Kits (Cat.nº P-7589)

#### **Panreac Quimica SA**

Ácido Clorídrico (PA) (Cat.nº 131020.1611)

#### **Sigma**

Clorofórmio (GBM) (Cat.nº C-2432)

Brometo de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (GBM) (Cat.nº H-6269)

Isopropanol (GBM) (Cat. nº I-9516)

Lizosima (GBM) (Cat. nº L-7651)

Proteinase K (GBM) (Cat. nº P-2308)

Trizma base (GBM) (Cat. nº T-1503)

### 2.2. Instrumentos

Utilizaram-se as centrifugas Sepatech Biofuge (Heraeus) e Biofuge fresco (Heraeus). Ambas possuem rotor com retenção de aerossóis, capacidade máxima de 24 tubos de 1,5 ou 2 ml e velocidade máxima de 15000rpm.

Para a quantificação de DNA usou-se o fluorímetro *SpectraMaxGeminiXs* (*Molecular Devices*).

O aparelho de PCR em tempo real utilizado foi o *iCycler* (Bio-Rad). Este possui uma fonte luminosa, um conjunto de filtros de excitação (que seleccionam o comprimento de onda de excitação do fluoróforo), um conjunto de filtros de emissão (que seleccionam o comprimento de onda de emissão do fluoróforo), um intensificador e um detector de sinal.

### 2.3. Receitas

#### **Tampão Tris-EDTA (TE) 10x**

O tampão TE (Tris-EDTA) 10x concentrado é constituído por 100mM de Tris/HCl a pH 8 e 10mM de EDTA. A estabilidade da solução autoclavada e guardada à temperatura ambiente é de 1 ano.

#### **Lizosima**

Prepara-se a solução de lizosima a 10mg/ml em água *MilliQ* (água destilada ultrapurificada) estéril e aliquota-se. Quando guardada a  $-20^{\circ}\text{C}$  apresenta uma estabilidade de 1 ano.

#### **SDS 10%**

Consiste na preparação de uma solução a 10% (m/v) de SDS em água *MilliQ* estéril. Aquecer a  $65^{\circ}\text{C}$  até dissolução completa. Não autoclavar. A estabilidade desta solução é de 1 ano à temperatura ambiente.

### **Proteinase K**

Prepara-se a solução de proteinase K a 10mg/ml em água *MilliQ* estéril e aliquota-se. Apresenta estabilidade de 1 ano, a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **SDS/Proteinase K**

No momento anterior à sua utilização, adiciona-se à solução de 10% SDS, proteinase K 10mg/ml numa proporção de 1/15.

### **NaCl 5M**

Consiste na preparação de uma solução de NaCl 5M em água *MilliQ*. A solução autoclavada apresenta estabilidade de 1 ano, à temperatura ambiente.

### **Solução de CTAB/NaCl**

Dissolve-se 4.1g de NaCl em 80 ml de água *MilliQ*. Adiciona-se 10g de CTAB e, se necessário, aquece-se a solução a  $65^{\circ}\text{C}$ . Ajusta-se o volume até 100ml com água *MilliQ*. Esta solução apresenta-se estável durante 6 meses à temperatura ambiente.

### **Etanol 70%**

Prepara-se uma solução de etanol a 70% em água *MilliQ* estéril. Manter a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Apresenta estabilidade de 1 ano.

## **2.4. Procedimentos**

### **2.4.1. Extração de DNA**

De cada estirpe clínica cultivada em meio de Lowenstein-Jensen retiraram-se colónias e colocaram-se num tubo de hemólise estéril contendo pérolas de vidro e procedeu-se à dispersão de grumos, por agitação em vortéx. De seguida, adicionou-se 400 $\mu\text{l}$  de TE 1x, transferiu-se a suspensão para um outro tubo e procedeu-se à inactivação celular num banho de água a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 40 minutos (min).

Após inactivação, adicionou-se lizosima numa concentração final de 1,1mg/ml e incubou-se a suspensão bacteriana a 37°C durante a noite. No dia seguinte, adicionou-se 75µl da solução SDS/proteinase K, homogeneizou-se e incubou-se no banho a 65°C durante 20 minutos. Seguidamente, adicionou-se 100µl de NaCl 5M e 100µl da solução CTAB/NaCl (de forma a obter uma concentração de sal não inferior a 0,5M) e procedeu-se à incubação a 65°C durante 15 min. Após adição de 750µl de clorofórmio e homogeneização manual vigorosa, as fases orgânicas e aquosas foram separadas por centrifugação durante 5 min a 13000 rpm à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante aquoso e adicionou-se isopropanol à fase remanescente numa proporção de 0,6 do volume total. O DNA foi precipitado a -20°C, geralmente durante a noite. Recolheu-se o DNA por centrifugação a 13000 rpm, durante 25 min a 4°C e o sedimento de DNA foi lavado com etanol a 70%. Os sedimentos foram secos à temperatura ambiente e redissolveram-se em 20µl de água *MilliQ* estéril. O DNA genómico assim extraído foi armazenado a -20°C até ser analisado.

Antes de proceder à extracção de DNA genómico de lâminas de exames directos positivos colocou-se em cada esfregaço 25µl de água destilada estéril e deixou-se em repouso cerca de 5 min. Passado este tempo, raspou-se a zona em questão com uma ança e retirou-se a suspensão obtida para um microtubo. De seguida, procedeu-se à extracção de DNA utilizando-se o mesmo protocolo referido anteriormente. Contudo, fizeram-se apenas as seguintes adaptações: adicionou-se 200µl de TE 1x, a incubação com lizosima foi de apenas 2 horas e adicionou-se 62µl de NaCl 5M e 62µl de CTAB/NaCl.

### 2.4.2. Quantificação de DNA

A quantificação de DNA genómico foi executada segundo as instruções do kit comercial, *Pico Green dsDNA Quantification Reagents and Kits*.

Sucintamente, a partir do padrão de Lambda DNA a 100µg/ml prepararam-se duas séries de diluições, uma de 2µg/ml a 2ng/ml e outra de 50ng/ml a 50pg/ml, destinadas ao estabelecimento de curvas de calibração “*high range*” e “*low range*” respectivamente. As amostras de DNA a quantificar foram diluídas na proporção de 1/100 em TE 1x. O

reagente *Pico Green* 1x foi preparado a partir do *stock* 200x concentrado por diluição em TE 1x, homogeneizado e protegido da luz. Em cada poço da placa de leitura (*FluoroNunc<sup>TM</sup>/LumiNunc<sup>TM</sup> Plates*, Cat. nº 237105) colocou-se 100µl de cada diluição de Lambda DNA e 100µl da diluição das amostras a quantificar adicionando-se seguidamente igual volume de *Pico Green* 1x. Após homogeneização, procedeu-se a uma incubação de 2 a 5 minutos à temperatura ambiente e no escuro.

A leitura da fluorescência a 520 nm foi feita num fluorímetro (*SpectraMax GeminiXs, Molecular Devices*). Finalmente, traçaram-se as curvas de calibração (fluorescência *versus* concentração de DNA), a partir das quais foram calculadas as concentrações de DNA de cada amostra.

#### 2.4.3. PCR em tempo real

A reacção de PCR foi executada num volume total de 20µl contendo *iQ<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup> Green Supermix* 1x (tabela 2.1), 2,5 pmol de cada “*primer*” (directo e reverso) e 0,1ng/µl de cada amostra de DNA a analisar.

Para cada amostra realizaram-se 4 ensaios de PCR em paralelo. Cada um destes ensaios difere no “*primer*” directo, contendo o mesmo “*primer*” reverso. Os quatro “*primers*” directos utilizados distinguem-se apenas pelo último nucleótido de forma a permitir a identificação da sequência “*wild type*” ou de uma de três possíveis mutações, no codão 315 do gene *katG*.

**Tabela 2.1** – Constituição da mistura *iQ<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup> Green Supermix* da Bio Rad.

Reagente	Constituintes da mistura
<i>SYBR Green Supermix</i>	KCL 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 0,2 mM de cada nucleótido Taq polimerase 25 unidades /ml SYBR Green I MgCl <sub>2</sub> 3mM Fluoresceína 10nM Estabilizadores

As reacções de PCR foram realizados no amplificador *iCycler* da BioRad, usando o seguinte programa: um ciclo de 95°C durante 10 minutos, seguido de 30 segundos a 70°C. O segundo ciclo repete-se 10 vezes e é composto por períodos de 30 segundos a 72°C, 20 segundos a 95°C e 30 segundos a 69°C. A temperatura deste último passo decresce 1°C de cada vez que se repete um ciclo. O terceiro e último ciclo consiste em períodos de 30 segundos a 72°C, 20 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C, repetindo-se 40 vezes (Hazbon e Alland, 2004).

O SYBR Green I ao ser incorporado nas moléculas de DNA amplificadas emite fluorescência que é captada e processada pelo *software iCycler*. Desta forma, é possível acompanhar a reacção de PCR e obter resultados em tempo real.

#### **2.4.4. Rota do DNA para evitar contaminações**

As diferentes fases do procedimento laboratorial foram executadas de forma a evitar a contaminação das amostras com DNA estranho às mesmas. Para isso, as fases de preparação da mistura de PCR e extracção de DNA decorreram em espaços físicos separados. Todas as soluções e misturas de PCR foram preparadas numa sala limpa. Um conjunto de micropipetas foi usado apenas para este fim e todo o material utilizado era estéril, tendo sido sempre manipulado com luvas.

A extracção de DNA foi realizada numa câmara de fluxo laminar de protecção ao utilizador, localizada no laboratório de segurança nível 3. Esta câmara de fluxo laminar só é utilizada para esta finalidade ou afins. No final de cada sessão de extracções de DNA, tanto a câmara como o material usado, foram desinfectados com etanol a 70%. A quantificação de DNA foi executada num outro laboratório, onde não se abrem recipientes com produtos biológicos, nem culturas de estirpes.

Para evitar a contaminação das pipetas e consequentemente das amostras de DNA, utilizaram-se pontas “*Art*” com filtro.

---

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*



---

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

O trabalho descrito nesta tese realizou-se no Centro de Tuberculose e Micobactérias do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Delegação no Porto. Sendo este o Laboratório de Referência para a Tuberculose em Portugal e membro da rede de laboratórios supranacionais da Organização Mundial de Saúde, recebe produtos biológicos e estirpes clínicas enviadas por laboratórios, centros de saúde e hospitais de diferentes zonas do país.

#### 3.1. Detecção de mutações no codão 315 do gene *katG* de estirpes clínicas de *M. tuberculosis*

##### 3.1.1 Caracterização das estirpes clínicas de *M. tuberculosis* estudadas

As estirpes de *M. tuberculosis* isoladas em meio de “*Lowenstein – Jensen*” são identificadas por provas bioquímicas ou sondas de DNA específicas para o complexo *M. tuberculosis* e são realizados testes de sensibilidade a drogas pelo método das proporções em meio sólido (“*Lowenstein – Jensen*”) ou em meio líquido (Sistema Bactec 460 [Becton Dickinson] ou Sistema Bactec Mgit 960 [Becton Dickinson]). Os isolamentos clínicos que apresentam resistências a antibióticos são guardados a 4°C para formação de um banco de estirpes e extracção de DNA para genotipagem.

Para a realização deste trabalho utilizaram-se 71 estirpes clínicas de *M. tuberculosis* isoladas durante o ano 2003 e 2004 que apresentavam resistência à isoniazida pelos métodos fenotípicos referidos no parágrafo anterior. Por consulta dos registos laboratoriais foi possível, para cada estirpe estudada, recolher a seguinte informação: zona do país de onde foi enviada, que instituição a enviou, qual o produto biológico colhido, o método de execução do antibiograma e respectivos resultados.

É importante salientar que este estudo não teve um carácter epidemiológico, isto é, a amostragem não obedeceu a parâmetros de representatividade. O objectivo desta análise é a caracterização das estirpes, enviadas ao nosso laboratório ou nele isoladas, que foram incluídas neste estudo.

No sentido de facilitar a análise da distribuição geográfica das estirpes estudadas, dividiu-se o país em 7 zonas diferentes. A Zona Norte compreende as províncias de Trás-

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

os-Montes, Minho e Douro Litoral com excepção do Porto. A Zona Centro inclui todos os concelhos pertencentes aos distritos de Aveiro e Viseu. A Zona Sul engloba o Alentejo e Algarve. As regiões autónomas da Madeira e Açores constituem outras duas zonas. Foram também criadas as zonas do grande Porto e Lisboa por serem as zonas responsáveis por um elevado número de estirpes enviadas ao nosso laboratório.

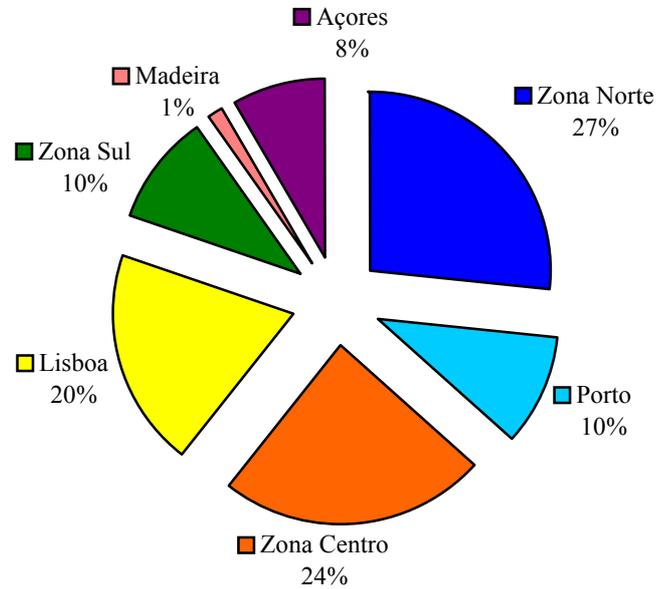
Como se pode observar na Tabela 3.1 e Figura 3.1 as Zonas Norte e Centro contribuíram com uma percentagem de estirpes semelhante, mas superior à dos outros grupos. A Zona Sul, que representa uma grande área geográfica, contém apenas 10% das estirpes. Lisboa e Porto, apresentam respectivamente 20% e 10% de todos os isolamentos clínicos de *M. tuberculosis* analisados. A percentagem das estirpes estudadas provenientes da Madeira é 1% e dos Açores é 8%.

Na sua totalidade o maior número de isolamentos recebidos são provenientes da zona litoral, registando-se um baixo número de estirpes provenientes do interior do país.

**Tabela 3.1**– Número de estirpes enviadas pelas diferentes zonas do país.

<b>Zona do País</b>	<b>Número de Estirpes (n=71)</b>
Zona Norte	19
Porto	7
Zona Centro	17
Lisboa	14
Zona Sul	7
Madeira	1
Açores	6

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*



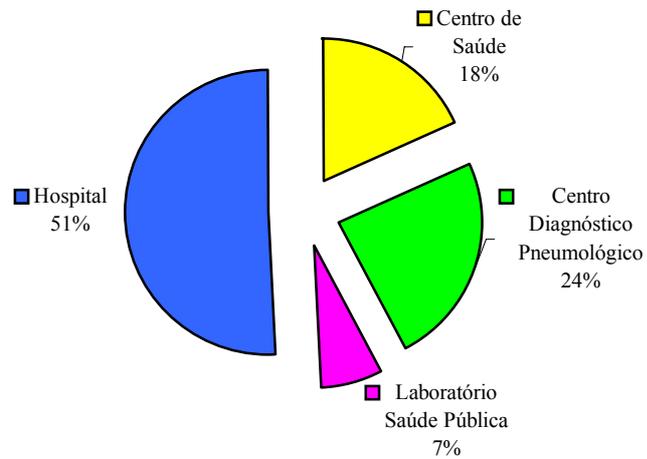
**Figura 3.1** – Representação percentual de estirpes enviadas pelas diferentes zonas do país.

As instituições que enviam regularmente estirpes para o Centro de Tuberculose e Micobactérias são Centros de Saúde (C.S.), Centros de Diagnóstico Pneumológico (C.D.P.), Hospitais e Laboratórios de Saúde Pública (L.S.P.). Como podemos ver na Tabela 3.2 e na Figura 3.2, 51%, o que constitui a grande maioria das estirpes, foi enviada por Hospitais, 18% por Centros de Saúde, 24% por Centros de Diagnóstico Pneumológico e apenas um número reduzido de 7% por Laboratórios de Saúde Pública.

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

**Tabela 3.2** – Número de estirpes enviadas pelas diferentes Instituições.

Instituição	Número de Estirpes (n=71)
Hospital	36
Centro Diagnóstico Pneumológico	17
Centro de Saúde	13
Laboratório Saúde Pública	5



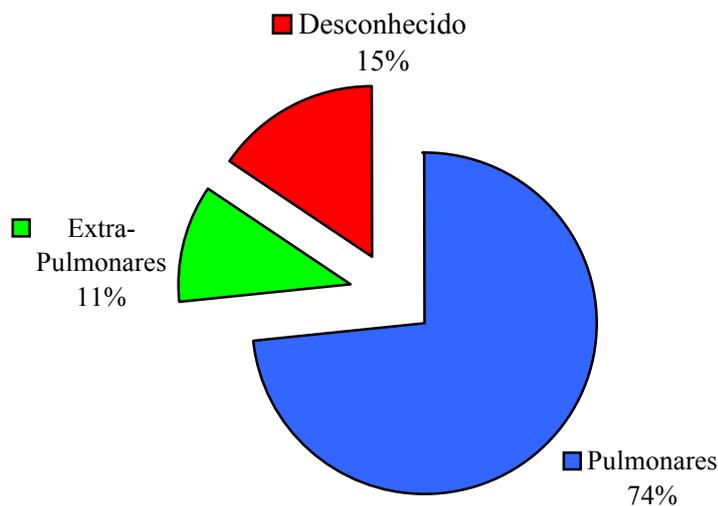
**Figura 3.2** – Percentagem de estirpes enviadas pelas diferentes Instituições.

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

A grande maioria, 74%, dos produtos biológicos a partir dos quais foram isoladas as diferentes estirpes corresponde a produtos pulmonares, visto que o pulmão é o órgão preferencialmente afectado pela infecção por *M. tuberculosis*. Neste grupo estão incluídos os sucos gástricos, de onde também se isolam bacilos devido à deglutição de expectoração. Para 11 estirpes não foi possível obter esta informação. A Tabela 3.3 e a Figura 3.3 mostram os produtos biológicos dos quais se isolaram as estirpes analisadas neste estudo.

**Tabela 3.3** – Número de estirpes e produto biológico correspondente.

Produto Biológico	Número de Estirpes (n=71)
Pulmonares	52
Pús	3
Líquido Pleural	2
L.C.R.	1
Biópsia Intestinal	1
Urina	1
Desconhecido	11



**Figura 3.3** – Percentagem de estirpes e produto biológico correspondente.

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

No laboratório estão implementadas três técnicas diferentes para a determinação da susceptibilidade aos fármacos antibacilares: o método das proporções em meio sólido de “*Lowenstein-Jensen*” para drogas de 1ª e 2ª linha, os sistemas Bactec 460 e Bactec Mgit 960, que usam meios líquidos, para drogas de 1ª linha. A escolha do método utilizado depende da preferência e prescrição do clínico que faz o pedido, da urgência em obter os resultados, do meio em que foi feito o isolamento e da existência prévia de outros antibiogramas do mesmo doente. A susceptibilidade aos fármacos foi determinada em meio sólido em 61% das estirpes estudadas e em meio líquido em 39%, como podemos ver na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4** – Número de estirpes e percentagem referente ao meio em que foram realizados os testes de sensibilidade a drogas.

Teste Sensibilidade Drogas	Número de Estirpes (n=71)	Percentagem de Estirpes
Meio Sólido	43	61
Meio Líquido	28	39

#### 3.1.2 Optimização da extracção de DNA genómico de estirpes clínicas de *M. tuberculosis*

A extracção de DNA genómico de *M. tuberculosis* realizou-se segundo o protocolo descrito por *D. van Soolingen* e colaboradores (1993), utilizado no Instituto Nacional de Saúde em *Bilthoven* na Holanda. Este protocolo de extracção demora cerca de 3 dias. Foi escolhido com o intuito de obter boa qualidade e quantidade de DNA genómico, que permitisse não só a realização deste trabalho como de outros estudos complementares a realizar no futuro. A escolha do protocolo teve em consideração o facto do *M. tuberculosis* ter um elevado conteúdo lipídico na parede celular, o que dificulta a lise necessária à extracção de DNA genómico. Este protocolo foi, inicialmente, aplicado a estirpes de *M. tuberculosis* sensíveis a todos os antibióticos e com elevado crescimento. Verificou-se a obtenção de baixas quantidades de DNA, tornando-se necessário proceder a uma

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

optimização do procedimento experimental referido. Assim, prolongou-se o tempo de inactivação celular e a incubação com lisozima, utilizada para destruir ligações entre constituintes do peptidoglicano da parede celular, foi a máxima descrita no procedimento. O tempo de incubação com a proteinase K foi aumentado, pois esta catalisa a hidrólise de ligações peptídicas, degradando as proteínas. Após a lise celular, a adição de CTAB que é um detergente catiónico, na presença de elevadas concentrações iónicas, forma complexos com proteínas e polissacarídeos, não precipitando os ácidos nucleicos. Deste modo, o tempo de incubação com esta solução também foi prolongado. Os complexos CTAB – proteínas/polissacarídeos são visíveis numa zona de interface após adição do clorofórmio e centrifugação. No protocolo estão descritas recomendações que foram tidas sempre em atenção, como por exemplo, a adição de 5M NaCl. A uma concentração de sal inferior a 0,5M pode ocorrer uma precipitação de ácidos nucleicos e impedir a obtenção de DNA. O tempo de precipitação do DNA também foi aumentado, deixando-se durante a noite a -20°C.

O DNA genómico, assim extraído, foi quantificado como se descreve na secção seguinte.

#### 3.1.3. Quantificação de DNA genómico de estirpes clínicas *M. tuberculosis*

A quantificação de DNA genómico foi executada usando o “*Pico Green*<sup>®</sup> *dsDNA Quantification Reagents and Kits*” que é um “*kit*” comercial específico para DNA de dupla cadeia (dsDNA). A execução deste procedimento demora apenas 2 a 3 horas.

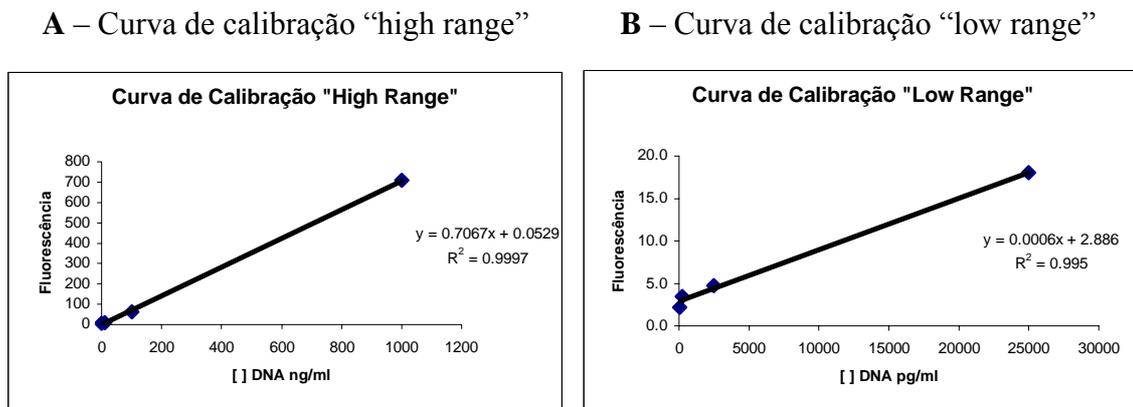
O “*kit*” é constituído por três reagentes. O reagente de quantificação “*Pico Green*<sup>®</sup>” liga-se a DNA de dupla cadeia tornando-se fluorescente. Detecta e permite a quantificação de pequenas quantidades de DNA, na ordem das 25pg/ml, numa grande variedade de aplicações biológicas. O Lambda DNA usado para a preparação de padrões de concentração conhecida, permite a elaboração de curvas de calibração de onde, por extrapolação, se determina a concentração de dsDNA presente na amostra a estudar. Finalmente, o tampão TE, totalmente isento de qualquer tipo de DNA, é utilizado para fazer as diluições necessárias à realização da técnica.

Foram desenhadas duas curvas padrão com limites de linearidade diferentes, como podemos ver na Figura 3.4. A mais utilizada foi a que tem como limites superior e inferior

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

1 $\mu$ g/ml e 1ng/ml, respectivamente. A grande maioria das amostras de DNA, diluídas a 1/200, apresentou concentrações dentro do intervalo de confiança desta curva. Apenas 7 amostras continham concentrações de DNA muito baixas, tendo sido necessário recorrer à curva de calibração que tem como limites superior e inferior 25ng/ml e 25pg/ml, respectivamente. Todas as estirpes estudadas apresentaram concentrações de DNA entre 200 $\mu$ g/ml e 200ng/ml, com excepção das 7 estirpes clínicas atrás referidas que tinham concentrações entre 5 $\mu$ g/ml e 5ng/ml.

As quantidades distintas de DNA obtidas podem dever-se a diferentes factores como a quantidade de cultura de que se partiu, diferenças entre as estirpes e idade da cultura.



**Figura 3.4** – Exemplo de curvas de calibração utilizadas em cada série de quantificações de DNA genómico de estirpes clínicas de *M. tuberculosis*.

#### 3.1.4. PCR em tempo real aplicado a DNA genómico de estirpes clínicas *M. tuberculosis*

A metodologia utilizada para a detecção e caracterização de polimorfismos de um só nucleótido no codão 315 do gene *katG* foi a descrita por Hazbon e Alland (2004).

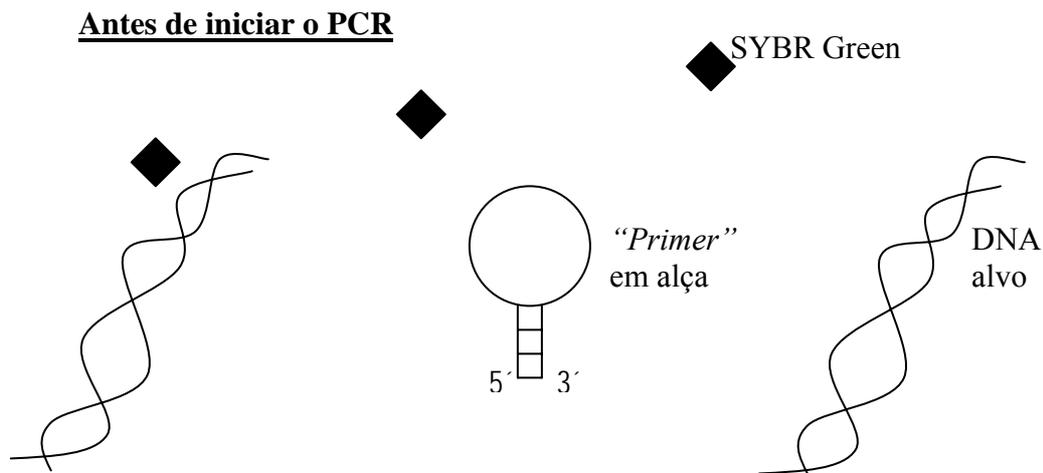
Nesta metodologia são utilizados “*primers*” designados por “*Hairpin primers*” que permitem a identificação da mutação. Os “*Hairpin primers*” apresentam uma conformação em alça para aumentar a especificidade da reacção. São cadeias simples de oligonucleótidos que hibridizam entre si nas extremidades devido à sua complementaridade, os nucleótidos situados mais interiormente da pequena cadeia não hibridizam e formam uma alça (Mhlanga e Malmberg, 2001). Estes, a temperaturas entre os 60°C e 65°C e na presença de sequências complementares, adquirem uma conformação linear e hibridizam com a cadeia de DNA complementar alvo, a DNA polimerase inicia a sua actividade de extensão adicionando nucleótidos à extremidade 3’, como está representado na Figura 3.5. (Bonnet *et al.*, 1999; Hazbon e Alland, 2004).

Para detectar e identificar a presença de mutações, para cada estirpe, realizaram-se 4 reacções de PCR em paralelo, cada um contendo um “*primer*” diferente. Um dos “*primers*” é perfeitamente complementar com a sequência *katG* 315 “*wyld type*”, e os outros três são complementares à sequência da mutação que se pretende identificar. Todos apresentam a mesma sequência com excepção do último nucleótido. Foi utilizado o mesmo “*primer*” reverso em todas as reacções. Este é perfeitamente complementar com a sequência que não possui mutações e tem uma conformação linear (Hazbon e Alland, 2004). Os “*primers*” utilizados estão apresentados no esquema abaixo representado (Figura 3.6), foram sintetizados pela Invitrogen de acordo com Hazbon e Halland (2004). Produzem produtos de PCR de 40 pares de bases (Hazbon e Alland, 2004).

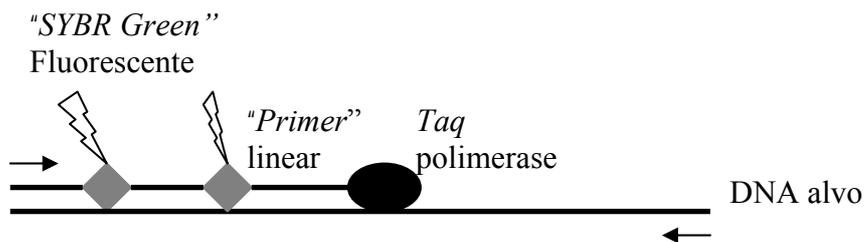
Na primeira fase do programa de PCR utilizado o primeiro ciclo a 95°C durante 10 minutos, permite activar a *Taq* polimerase e desnaturar as cadeias de DNA alvo que apresentam uma elevada percentagem de citosinas e guaninas, necessitando de mais energia para se dissociarem (Cole *et al.*, 1998). Ao atingir a temperatura de “*annealing*” os “*Hairpin primers*” hibridizam com a cadeia de DNA alvo complementar, iniciando-se aí a reacção de PCR (Mhlanga e Malmberg, 2001). O ensaio em que existir total complementaridade entre o “*primer*” e a sequência em estudo a extensão é mais eficiente.

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

Os outros “*primers*” também hibridizam, mas a formação de produto é menor, ocorre mais tardiamente e com baixa eficiência. A observação da formação do produto de PCR é possível devido à incorporação de moléculas de “SYBR Green I”.



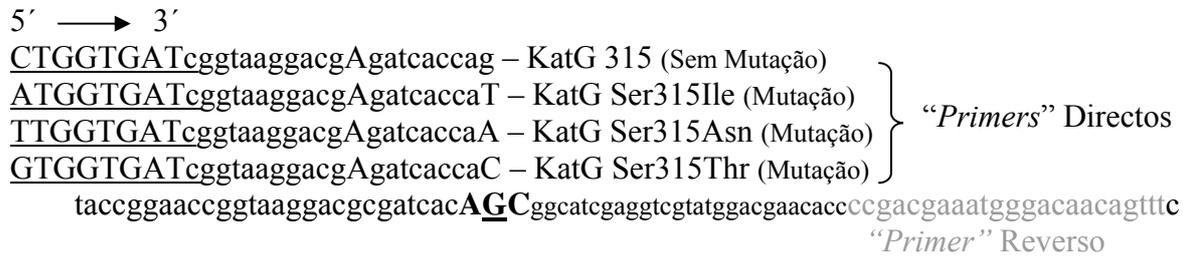
### **Formação de Produto de PCR - Amplificação**



Antes do início da amplificação o “SYBR Green I” está em solução, os “*primers*” apresentam uma conformação em alça e o DNA alvo mantém a sua estrutura e conformação. Durante a formação do produto de PCR, a cadeia de DNA alvo e os “*primers*” perdem a sua estrutura e conformação, hibridizando entre si em zonas de total complementaridade. O “SYBR Green I” intercala-se na cadeia dupla de DNA recém formada e torna-se fluorescente, permitindo visualizar e monitorizar a formação do produto.

**Figura 3.5** - Esquema representativo do fundamento da técnica utilizada.

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*



No que se refere aos “*primers*” directos, os nucleótidos que estão representados com maiúsculas e sublinhados correspondem à extremidade 5' que vai hibridizar com os 8 nucleótidos complementares da extremidade 3'. O nucleótido representado por um A maiúsculo (Adenina) corresponde a uma alteração que foi introduzida por conferir flexibilidade e permitir a formação e estabilização da estrutura secundária em alça. A sequência do “*primer*” reverso está apresentada a cinzento (Hazbon e Alland, 2004).

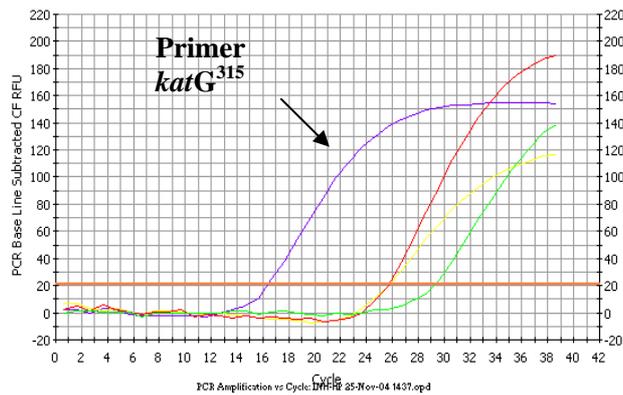
---

**Figura 3.6** – Sequências dos “*primers*” utilizados nos 4 ensaios realizados em paralelo para cada estirpe.

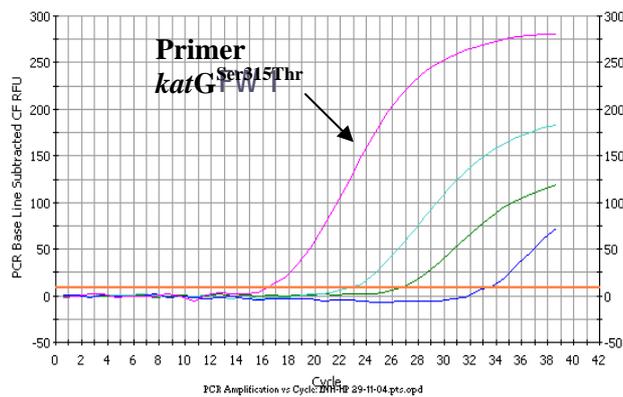
Os resultados do PCR são observados sob a forma de gráfico (Hazbon e Alland, 2004). Na Figura 3.7 pode observar-se os resultados do PCR de duas estirpes diferentes. A primeira reacção a positivar identifica a sequência a determinar. Nas reacções de PCR efectuadas e de acordo com o descrito, o primeiro “*primer*” positiva entre os ciclos 15 a 22, demonstrando elevada eficiência. Os outros “*primers*” em que não existe total complementaridade positivam entre os ciclos 25 e 33, apresentando menores eficiências. Estes positivam 4 a 8 ciclos mais tarde que o primeiro (Ayyadevara *et al.*, 2000).

Em todas as séries foi incluído um controlo contendo DNA genómico da estirpe H<sub>37</sub>Rv e um controlo negativo em que a amostra de DNA é substituída por água.

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*



Estirpe “wild type”  
*KatG* 315



Estirpe com mutação  
*KatG* Ser315Thr

**Figura 3.7** – Exemplo do resultado de reacções de PCR de 2 estirpes diferentes.

O primeiro gráfico corresponde a uma estirpe que não apresenta mutações no codão 315 do gene *katG*, verificando-se total complementaridade entre o DNA alvo e o “*primer*” complementar à sequência “wild type”. Como se vê a reacção com o “*primer*” *KatG* 315 positiva ao 16º ciclo, antes das outras reacções com os outros “*primers*”. O segundo gráfico representa uma estirpe com mutação Ser315Thr em que há total complementaridade entre o DNA em estudo e a sequência do “*primer*” que identifica esta mutação.

### 3.1.5. Optimização e verificação da correcção dos resultados

Para verificação dos resultados obtidos com a metodologia implementada, utilizaram-se estirpes que integraram o programa de controlo de qualidade do ano 2003 da Organização Mundial de Saúde para os laboratórios supranacionais (“*Quality assessment of drug susceptibility testing of M. tuberculosis, first-line drugs, supra-national reference laboratories, round 10, 2003*”). Estudaram-se 25 estirpes resistentes à isoniazida e cuja sequência do codão 315 do gene *katG* era conhecida, o que permitiu comparar os resultados enviados pela OMS com os resultados obtidos usando este método. Em 17 estirpes identificou-se a mutação *katG* Ser315Thr. Uma estirpe apresentava a mutação *katG* Ser315Ile e outra a mutação *katG* Ser315Asn. As restantes 6 estirpes eram “*wild type*” para este codão (Tabela 3.5).

**Tabela 3.5** - Resultados obtidos para as estirpes do controlo de qualidade da OMS. Número de estirpes e respectiva mutação identificada.

<b>Resultados Obtidos</b>	<b>Número de Estirpes (n=25)</b>
<i>KatG 315 Wild Type</i>	6
<i>katG S315T</i>	17
<i>katG S315I</i>	1
<i>katG S315N</i>	1

Todas as estirpes do painel do controlo de qualidade foram tipadas com sucesso sendo os resultados obtidos coincidentes com os fornecidos pela OMS. A metodologia escolhida produziu os resultados esperados e por este motivo, considerou-se que a técnica é válida para a análise de estirpes clínicas.

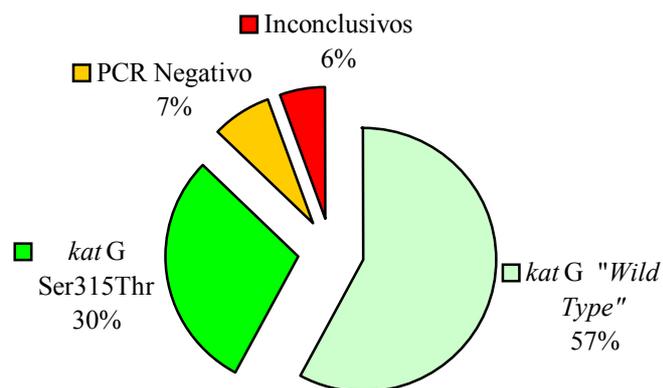
O H37Rv utilizou-se em cada série de reacções como controlo positivo. Por outro lado, permitiu também verificar a reprodutibilidade dos resultados, ocorrendo a formação dos produtos de PCR nos mesmos ciclos, no decorrer das diferentes experiências realizadas.

**3.1.6. Análise dos resultados obtidos no estudo das estirpes clínicas de *M. tuberculosis***

A análise das 71 estirpes clínicas incluídas neste estudo permitiu verificar que 41 isolados, 57%, não apresentava mutação no codão 315 do gene *katG* (Tabela 3.6 e Figura 3.8). Apenas 21 estirpes, 30%, apresentam a mutação em que há substituição de uma serina por uma treonina. Não foram identificadas as mutações *katG* Ser315Ile e *katG* Ser315Asn.

**Tabela 3.6-** Resultados obtidos para as estirpes clínicas estudadas.

Resultados Obtidos	Número de Estirpes (n=71)
<i>katG</i> Wild Type	41
<i>katG</i> Ser315Thr	21
PCR Negativo	5
Inconclusivos	4



**Figura 3.8—** Percentagem dos resultados obtidos para as estirpes estudadas.

---

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

É sabido que a incidência desta mutação varia geograficamente. Estudos efectuados em regiões com baixa prevalência de TB, verificaram que uma pequena percentagem de estirpes resistentes à INH contém a mutação *katG* Ser315Thr. Singapura (Lee *et al.*, 1999), Madrid (Piatek *et al.*, 2000), Escócia (Fang *et al.*, 1999) e Finlândia (Martilla *et al.*, 1996) apresentam 26 a 30% de estirpes com esta mutação e no Texas também cerca de um terço das estirpes resistentes à INH apresentam este genótipo (Ramaswamy *et al.*, 2003). No entanto, em África (Haas *et al.*, 1997), no Peru (Escalante *et al.*, 1998), em Nova Iorque (Piatek *et al.*, 2000), Filipinas (Herrera *et al.*, 2004), Brasil (Silva *et al.*, 2003) e Polónia (Sajduda *et al.*, 2004) verificou-se que 50 a 80% das estirpes apresenta a mutação *katG* Ser315Thr e a Rússia apresenta 91% (Martilla *et al.*, 1998; Mokrousov *et al.*, 2002).

A percentagem de estirpes com mutação no codão 315 do gene *katG* encontrada neste trabalho é semelhante àquela descrita para Finlândia, Escócia, Singapura. É interessante notar que Piatek e colaboradores (2000), num estudo realizado em Madrid, relatam uma realidade semelhante à aqui descrita, o que pode ser explicado pela proximidade geográfica dos dois países.

A ausência das mutações *katG* Ser315Ile e *katG* Ser315Asn nas estirpes estudadas é um dado que está de acordo com o que vem descrito na literatura. Apenas 2 a 10% das estirpes resistentes à INH possuem estas mutações (Ramaswamy *et al.*, 2003; Doorn *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2004). Por este motivo, muitos investigadores dedicam-se apenas à pesquisa da mutação *katG* Ser315Thr em estirpes clínicas.

Para 5 estirpes obtiveram-se resultados negativos em que não houve a formação de produto de PCR. Possivelmente, estes resultados podem dever-se à baixa concentração de DNA que foi obtida para estas amostras ou à presença de inibidores do PCR. De acordo com a ficha laboratorial, três destas estirpes correspondiam a doentes que estavam a ser estudados pela primeira vez neste laboratório. As outras duas correspondiam a indivíduos que têm vindo a ser regularmente acompanhados e para os quais foi possível caracterizar outros isolamentos obtidos em tempos diferentes. Num dos casos, verificou-se a presença da mutação *katG* Ser315Thr, o que está de acordo com o elevado nível de resistência apresentado pelo método das proporções em meio sólido. No outro caso, a genotipagem da estirpe do doente permitiu verificar a ausência de mutações no codão em estudo, sendo que

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

também está de acordo com o fenótipo de baixo nível de resistência apresentado pelo teste de sensibilidade a drogas em meio sólido.

Em 4 estirpes, a análise dos resultados de PCR foi inconclusiva porque não foi possível identificar inequivocamente a sequência do codão 315 do gene *katG*. As reacções contendo os 4 “*primers*” diferentes positivaram todas no mesmo ciclo ou com diferenças de apenas 1 a 2 ciclos, o que não permite tirar conclusões fiáveis. Uma possível explicação para este facto é estar perante uma mistura de estirpes de *M. tuberculosis*, que sejam *katG* “*wild type*” e *katG* Ser315Thr, visto que os “*primers*” complementares a estas duas sequências positivaram no mesmo ciclo. De acordo com os registos, três destas estirpes correspondiam a doentes estudados pela primeira vez, pelo que não é possível esclarecer o resultado por recurso a outros isolamentos do mesmo doente. A quarta estirpe apresenta um fenótipo de resistência à INH de baixo nível. Relacionando este facto com os resultados obtidos colocam-se diferentes possibilidades. Pode-se estar perante uma co-infecção causada por pelo menos 2 estirpes de *M. tuberculosis* diferentes, que sejam *katG* “*wild type*” e *katG* Ser315Thr ou, por outro lado, é interessante especular a possibilidade de existir uma população bacilar que contenha mutantes que apresentem resistência de elevado nível à INH devido à ocorrência de mutações no codão em estudo.

Existem estudos que relacionam mutação no codão 315 do *katG* com elevados níveis de resistência à isoniazida (Soolingen *et al.*, 2000; Doorn *et al.*, 2003). Nos testes de susceptibilidade a drogas, para além de se testar a concentração crítica para esta droga, é importante avaliar-se o crescimento da estirpe na presença de uma concentração mais elevada, o que permite determinar o nível de resistência da estirpe ao fármaco. Em meio sólido foi testada a concentração crítica 0,2µg/ml e uma concentração superior de 1µg/ml. Em meio líquido apenas é testada a concentração 0,1µg/ml, que é equivalente a 0,2µg/ml em meio sólido de “*Lowenstein-Jensen*”. Assim, a análise dos níveis de resistência só é possível para as estirpes cujo teste de sensibilidade aos fármacos foi realizado em meio sólido. Define-se como resistente uma estirpe que mais de 1% do seu inóculo cresce na presença da concentração crítica da droga ensaiada (Woods *et al.*, 2003).

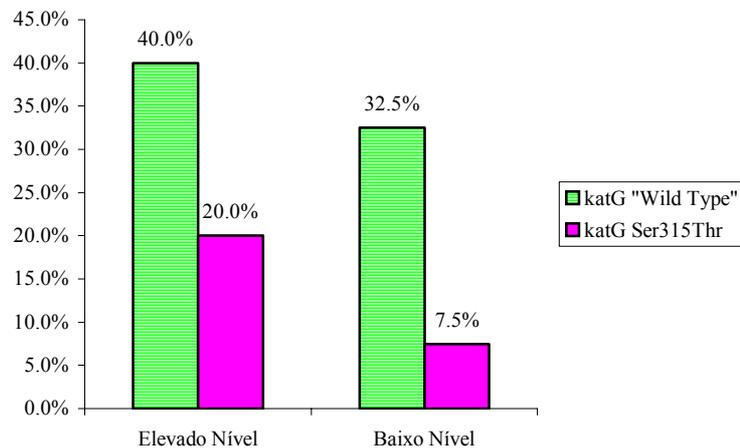
De acordo com todos os dados recolhidos referentes a cada amostra e respectiva genotipagem é possível estabelecer algumas comparações e comentários. Das 40 estirpes que foram estudadas pelo método das proporções em meio sólido e para as quais se obteve

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

reações de PCR conclusivas, verificou-se que 60% apresenta um elevado nível de resistência à INH, como podemos ver na Tabela 3.7 e na Figura 3.9. Destas, 40% não apresentam mutação no codão em estudo e 20% tem a mutação *katG* Ser315Thr. Dos 27,5% isolados clínicos com mutação *katG* Ser315Thr, 20% das estirpes apresentam um elevado nível de resistência, o que está de acordo com outros estudos (Soolingen *et al.*, 2000; Doorn *et al.*, 2003). Por outro lado, 40% das estirpes “*wild type*” para este codão também apresentamo fenótipo de elevado nível de resistência à INH, podendo-se dever a outras mutações, possivelmente noutros genes.

**Tabela 3.7** – Número de estirpes *katG* 315 “*wild type*” e *katG* Ser315Thr e respectivo nível de resistência à INH.

	<i>katG Wild Type</i>	<i>katG Ser315Thr</i>
Elevado Nível	16	8
Baixo Nível	13	3



**Figura 3.9** – Percentagens de estirpes *katG* 315 “*wild type*” e *katG* Ser315Thr e respectivo nível de resistência à INH.

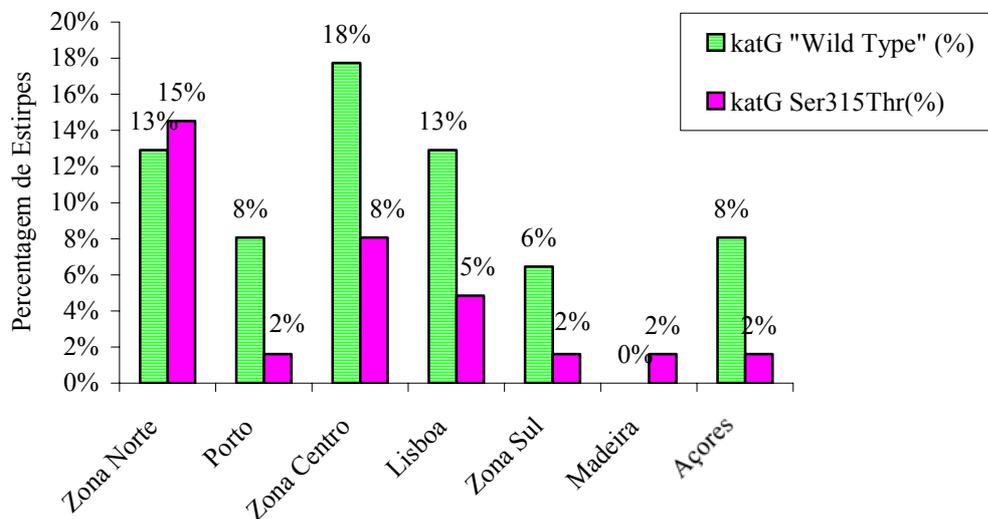
Como podemos verificar na Tabela 3.8 e Figura 3.10, em todas as zonas do país existem casos de resistência à INH devido à mutação *katG* Ser315Thr, contudo, é interessante observar que a Zona Norte é o único grupo que apresentam uma maior

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

percentagem de estirpes *katG* Ser315Thr relativamente às estirpes *katG* “wild type”. No que se refere à Madeira, apenas foi estudada uma estirpe, não se podendo estabelecer um paralelismo com a situação anterior.

**Tabela 3.8** – Número de estirpes *katG* 315 “wild type” e *katG* Ser315Thr de acordo com o sua distribuição geográfica pelas zonas consideradas.

Zona do País	<i>katG Wild Type</i>	<i>katG S315T</i>
Zona Norte	8	9
Porto	5	1
Zona Centro	11	5
Lisboa	8	3
Zona Sul	4	1
Madeira	0	1
Açores	5	1



**Figura 3.10** - Percentagem de estirpes *katG* 315 “wild type” e *katG* Ser315Thr de acordo com a sua distribuição geográfica.

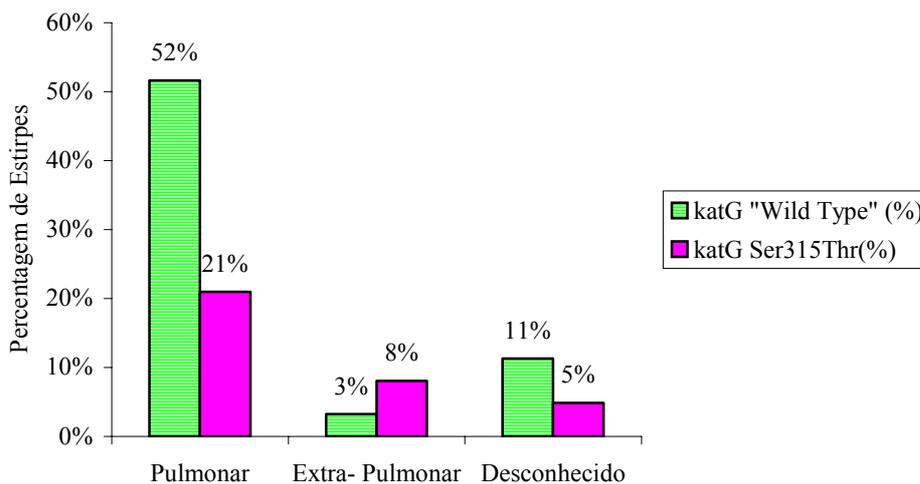
### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

O maior número de estirpes estudadas foi isolado de produtos pulmonares, pois a forma mais frequente da doença é a TB pulmonar (Tabela 3.9 e Figura 3.11). A maior percentagem, 52%, destes isolamentos não apresentam a mutação em estudo. As estirpes estudadas, obtidas de produtos extra-pulmonares, foram apenas 7. Destas, 5 apresentavam a mutação *katG* Ser315Thr.

Não é possível comentar ou comparar estes resultados com outros estudos, pois em Portugal, não se verificou a existência deste tipo de trabalhos e a nível internacional também não se regista este tipo de análise.

**Tabela 3.9** - Número de estirpes *katG* 315 “wild type” e *katG* Ser 315Thr de acordo com o produto biológico de onde foram isoladas.

Produto Biológico	<i>katG</i> Wild Type	<i>katG</i> S315T
Pulmonar	32	13
Extra - Pulmonar	2	5
Desconhecido	7	3



**Figura 3.11** - Percentagens de estirpes *katG* 315 “wild type” e *katG* Ser 315Thr de acordo com o produto biológico de onde foram isoladas.

### 3.2 Detecção de mutações no codão 315 do gene *katG* a partir de DNA extraído de exames directos positivos

#### 3.2.1 Caracterização dos exames directos positivos estudados

Para a realização deste trabalho arquivaram-se esfregaços de exames directos positivos, corados pelo método de fluorescência, cuja observação era sugestiva de *M. tuberculosis* e apresentavam um número de bacilos superior a 10 em 100 campos. O método de coloração consiste na utilização de auramina, que permite a observação de bacilos álcool-ácido resistentes numa tonalidade amarela fluorescente, uma solução de álcool-ácido descolorante e um segundo corante, o vermelho de tiazina que funciona como contraste, observando-se com uma tonalidade castanha escura. A nomenclatura para a quantificação do número de bacilos observado utilizada no laboratório é a recomendada pela OMS, que prevê as seguintes situações: não se observarem bacilos álcool-ácido resistentes; observarem-se 1 a 9 bacilos álcool-ácido resistentes em 100 campos; 10 a 99 bacilos álcool-ácido resistentes em 100 campos; 1 a 10 bacilos álcool-ácido resistentes por campo; mais de 10 por campo.

A extracção de DNA a partir do esfregaço foi efectuada após a obtenção de resultados da identificação e teste de sensibilidade às drogas da estirpe isolada correspondente.

#### 3.2.2. Análise dos resultados obtidos no estudo do DNA extraído de exames directos positivos

Foi possível a extracção de DNA de exames directos positivos corados pelo método da fluorescência auramina/vermelho de tiazina. Utilizaram-se esfregaços com um número de BAAR superior a 10 por 100 campos, de onde se obteve concentrações de DNA entre 5µg/ml e 5ng/ml, quer isto dizer, dentro dos limites de linearidade da curva padrão “low range”.

Esta técnica foi aplicada a um total de 20 lâminas, sendo 13 correspondentes a doentes dos quais se isolaram estirpes sensíveis a todos os antibióticos e 7 correspondentes a doentes dos quais se isolaram estirpes resistentes à isoniazida. Três destes esfregaços

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

correspondiam a estirpes já tipadas, no que diz respeito ao codão 315 do gene *katG*, no trabalho descrito na secção anterior.

A metodologia utilizada para a detecção e caracterização de polimorfismos de um só nucleótido no codão 315 do gene *katG* foi a descrita por Hazbon e Alland (2004).

No que se refere aos “*primers*” utilizados verificou-se, em bases de dados da NCBI que permitem a comparação de sequências de DNA, a ausência de complementaridade com outras zonas do genoma do *M. tuberculosis*. Contudo, verificou-se que outros microorganismos possuem este gene. Os que apresentam maior similaridade com a espécie em estudo são o *Mycobacterium bovis* e o *Mycobacterium intracelular*, registando-se diferenças de 2 a 3 nucleótidos no possível local de hibridização dos “*primers*” directos e reversos. Não existindo total complementaridade, estes não hibridizam e, conseqüentemente, não se verifica a formação de produto de PCR.

Os resultados obtidos pelo método de PCR em tempo real foram analisados tendo em atenção os resultados dos testes de sensibilidade às drogas, pelo método das proporções utilizado na rotina do laboratório, tendo-se observado concordância entre ambos. Verificou-se também que a identificação da sequência do codão 315 do gene *katG* de três das amostras de DNA de lâminas correspondentes a estirpes já tipadas também foi coincidente. Todas as amostras de DNA extraídas a partir das 13 lâminas correspondentes a estirpes sensíveis aos antibióticos eram “*wild type*” para o codão 315 do gene *katG*. Das 7 amostras que correspondiam a estirpes resistentes à INH, apenas duas possuíam a mutação em que há substituição de uma serina por uma treonina no codão em estudo (Tabela 3.10). Deste modo, mutações noutra local do *katG* ou noutros genes são possivelmente responsáveis pelo fenótipo de resistência à INH.

**Tabela 3.10** – Número de estirpes *katG* 315 “*wild type*” e *katG* Ser315Thr de acordo com o seu fenótipo.

	<b>Estirpes Sensíveis</b>	<b>Estirpes Resistentes</b>
<i>katG</i> 315 “ <i>wild type</i> ”	13	5
<i>katG</i> Ser315Thr	0	2

---

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

Existem apenas dois trabalhos publicados em que se descreve a identificação de mutações responsáveis pelo desenvolvimento de resistências à rifampicina a partir de DNA genómico de *M. tuberculosis* extraído de esfregaços (Patnaik *et al.*, 2001; Zanden *et al.*, 2003). Estes estudos demonstram a aplicabilidade e fiabilidade deste método permitindo a obtenção de um diagnóstico muito mais rápido, sem necessidade de esperar pela obtenção de uma cultura. A metodologia utilizada neste trabalho e aplicada à detecção da resistência à INH corrobora o trabalho dos investigadores atrás referidos. Isto é, a extracção de DNA de *M. tuberculosis* a partir de lâminas coradas é bem sucedida, assim como o PCR em tempo real para a detecção de mutações no codão 315 do gene *katG*. Tudo isto, tem a grande vantagem de decorrer num período de 5 dias por contraponto às 6 a 12 semanas que os processos clássicos demoram a produzir resultados.





---

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

Sendo a tuberculose um grave problema mundial de saúde pública, torna-se necessário o desenvolvimento e implementação de técnicas que contribuam para um diagnóstico rápido, diminuindo o tempo de espera para dar início a uma terapêutica adequada. Por outro lado, é de extrema importância conhecer o perfil das estirpes de *M. tuberculosis* responsáveis pelo desenvolvimento da doença em cada região/país.

O Centro de Tuberculose e Micobactérias é um Laboratório de Referência Nacional que recebe produtos biológicos e estirpes clínicas vindas de todo o país. Este estudo, apesar de não ter um carácter epidemiológico, permitiu caracterizar todas as estirpes clínicas que apresentaram resistência à isoniazida durante os anos de 2003 e 2004. Foi implementada uma técnica de PCR em tempo real que permite identificar mutações no codão 315 do gene *katG*. Este gene é responsável pela activação da isoniazida, que é uma das principais drogas usadas no tratamento da tuberculose. Verificou-se que cerca de 30% das estirpes clínicas apresentavam a mutação no codão estudado, sendo que em todas houve substituição de uma serina por uma treonina. A literatura existente refere diferentes percentagens de ocorrência desta mutação, variando em função da área geográfica. Os resultados obtidos neste estudo são semelhantes aos descritos para Madrid/Espanha, o que é justificável pela sua proximidade geográfica, apesar de Portugal apresentar taxas de incidência de tuberculose superiores. As restantes estirpes que apresentam o genótipo *katG* 315 “*wild type*”, devem possuir mutações noutros genes que conferem resistência à INH.

Após a obtenção de uma cultura e utilizando a técnica aqui implementada, a determinação dos resultados pode demorar cerca de 5 dias, o que é vantajoso. Assim, os métodos fenotípicos são mais morosos, pois necessitam de aguardar o isolamento e crescimento da estirpe na presença do antibiótico. Ainda na tentativa de encurtar cada vez mais o tempo de espera de diagnóstico, adaptou-se a técnica utilizada neste trabalho e aplicou-se a DNA genómico extraído de lâminas de exames directos positivos. Os resultados revelaram-se promissores, pois para determinar a presença de mutações no codão 315 do gene *katG* não é necessário obter uma cultura da estirpe, o que significa uma resposta ainda mais rápida a partir do momento em que o produto biológico chega ao laboratório.

---

### 3. Detecção de Resistência à Isoniazida em *M. tuberculosis*

É importante, também, o estudo de outras mutações no gene *katG* ou de mutações noutros genes que interagem com o mecanismo de acção da INH levando ao desenvolvimento de resistência a esta droga.

De futuro, neste laboratório, prevê-se a implementação de técnicas rápidas que possibilitam a identificação de mutações responsáveis pelo desenvolvimento de resistências a outras drogas, utilizadas no tratamento da tuberculose, nomeadamente à RPM e ao EMB.





- Aaron, L., Saadoun, D., Calatroni, I., Launay, O., Mémain, N., Vincent, V., Marchal, G., Dupont, B., Bouchaud, O., Valeyre, D. e Lortholary, O. (2004) Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. *Clinical Microbiology and Infection* **10**, 388-398.
- Ayyadevara, S., Thaden, J., Robert, J. e Shmookler, R. (2000) Discrimination of primer 3'-Nucleotide Mismatch by Taq DNA Polymerase during Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* **284**, 11-18.
- Bertrand, T., Eady, N., Jones, J., Jesmin, Nagy, J.M., Jamart- Grégoires, B., Raven, E.L. e Brown, K.A. (2004) Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. *The journal of Biological Chemistry* **279**(37), 38991-38999.
- Bloom, B.R. (1994) Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control, pp. 271-530. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Boer, A.S., Borgdorff, M.W., Haas, P.E.W., Nagelkerke, N.J.D., Emben, J.D.A. e Soolingen, D. (1999) Analysis os Rate of Change of IS6110 RFLP Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Serial Patients Isolates. *The journal of Infectious Disease* **180**, 1238-1244.
- Bonnet, G., Tyagi, S., Libchaber, A. and Kramer, F.R. (1999) Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6171-6176.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., Sooligan, D. e Cole, S.T. (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(6), 3684-3689.

- Cardona, P., Gordillo, S., Amat, I., Díaz, J., Lonca, J., Vilaplana, C., Pallarés, A., Llatjós, R., Ariza, A. e Ausina, V. (2003) Catalase-peroxidase activity has no influence on virulence in a murine model of tuberculosis. *Tuberculosis* **83**, 351-359.
- Chan, E. e Iseman, M. (2002) Current Medical Treatment for Tuberculosis. *British Medical Journal* **325**, 1282-1286.
- Cingolani, A., Antinori, A., Sanguinetti, M., Gillini, L., Luca, A., Posteraro, B., Ardito, F., Fadda, G. e Ortona, L. (1999) Application of molecular methods for detection and transmission analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Drug resistance in patients attending a reference hospital in Italy. *The Journal of Infectious Diseases* **179**, 1025-1029.
- Coker, R.J. (2004) Multidrug-resistant tuberculosis: public health challenges. *Tropical Medicine and International Health* **9**(1), 25-40.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. e Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544.
- Crick, D.C., Mahapatra, S. e Brennan, P.J. (2001) Biosyntheses of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* **11**(9), 107R-118R.

- DeVito, J.A. e Morris, S. (2003) Exploring the structure and function of the mycobacterial *KatG* protein using *trans*-dominant mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**(1), 188-195.
- Doorn, H.R., Claas, E.C.J., Templeton, K.E., Zanden, A.G.M., Vije, A.K., Jong, M.D., Dankert, J. e Kuijper, E.J. (2003) Detection of a point mutation associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by using real-time PCR technology with 3'-minor groove binder-DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(10), 4630-4635.
- Drobniewski, F., Balabanova, Y. e Coker, R. (2004) Clinical features, diagnosis, and management of multiple drug-resistant tuberculosis since 2002. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* **10**, 211-217.
- Embden, J.D.A., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J.W., Eisenach, K.D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T.M. e Small, P.M. (1993) Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology. *Journal of Clinical Microbiology* **31**(2), 406-409.
- Escalante, P., Ramaswamy, S., Sanabria, H., Soini, H., Pan, X., Valiente-Castillo, O. e Musser, J.M. (1998) Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tubercle and Lung Disease* **79**(2), 111-118.
- Espinal, M.A. (2003) The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis* **83**, 44-51.
- Fang, Z., Doig, C., Rayner, A., Kenna, D.T., Watt, B. e Forbes, K.J. (1999) Molecular evidence for heterogeneity of the multiple-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* population in Schotland (1990-1997). *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 998-1003.

- Giglio, S., Monis, P.T. e Saint, C.P. (2003) Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research* **31**(22).
- Haas, W.H., Schilke, K., Brand, J., Amther, B., Weyner, K., Fourier, P.B., Britzel, G., Groh-Stich, V. e Bremer, H.J. (1997) Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**(7), 1601-1605.
- Hazbon, M.H. e Alland, D. (2004) Hairpin Primers for simplified single-nucleotide polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and other organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(3), 1236-1242.
- Helps, C., Lait, P., Tasker, S. e Harbour, D. (2002) Melting Curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real time reverse transcription PCR. *Journal of Virological Methods* **106**, 241-244.
- Herrera, L., Valverde, A., Saiz, P., Sáez-Nieto, J.A., Portero, J.L., Jiménez, M.S. (2004) Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in the Philippines. *International Journal of Antimicrobial Agents* **23**, 572-576.
- Johnsson, K., Froland, W.A. e Schultz, P.G. (1997) Overexpression, purification, and characterization of the catalase peroxidase *KatG* from *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry* **272**(5), 2834-2840.
- Koneman, E., Allen, S., Janda, W. e Schreckenberger, P. (1997) Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, pp. 893-943. Lippincott, fifth edition.
- Kaps, I., Ehrt, S., Seeber, S., Schnappinger, D., Martin, C., Riley, L.W. e Niederweis, M. (2001) Energy transfer between fluorescent proteins using a co-expression system in *Mycobacterium smegmatis*. *Gene* **278**, 115-124.

- Lee, A.S.G., Lim, I.H.K., Tang, L.L.H., Telenti, A., e Wong, S.Y. (1999) Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(8), 2087-2089.
- Lee, A.S.G., Teo, A.S.M. e Wong, S. (2001) Novel mutations in *ndh* in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(7), 2157-2159.
- Mackay, I.M., Arden, K.E. e Nitsche, A. (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* **30**(6), 1292-1305.
- Marino, J., Cook, P. e Miller, K. (2003) Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR. *Journal of Immunological Methods* **283**, 291-306.
- Martilla, H.J., Soini, H., Huovinen, P. e Viljanen, M.K. (1996) *katG* Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Recovered from Finnish Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**(9), 2187-2189.
- Martilla, H.J., Soini, H., Eerola, E., Vyshnevskaya, E., Vyshnevskiy, B.I., Otten, T.F., Vasilyef, A.V. e Viljanen, M. (1998) A Ser315Thr substitution in *KatG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**(9), 2443-2445.
- Medicina para el médico del siglo XXI (2004) Actualización em epidemiologia. Tuberculosis: la epidemia preocupa de nuevo al mundo 1999-2004 <http://www.IDALIBA.com>

- Mhlanga, M.M. e Malmberg, L. (2001) Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. *Methods* **25**, 463-471.
- Miesel, L., Weisbrod, T.R., Marcinkeviciene, J.A., Bittman, R. e Jacobs, W.R. (1998) NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology* **180**(9), 2459-2467.
- Mokrousov, I., Narvskaya, O., Otten, T., Limeschenko, E., Steklova, L. e Vyshnevskiy, B. (2002) High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**(5), 1417-1424.
- Mokrousov, I., Otten, T., Vyshnevskiy, B. e Narvskaya, O. (2003) Allele-Specific *rpoB* PCR Assays for Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Smears. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**(7), 2231-2235.
- Morlock, G.P., Metchock, B., Sikes, D., Crawford, J.T. e Cooksey, R.C. (2003) *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**(12), 3799-3805.
- Mukherjee, J.S., Rich, M.L., Socci, A.R., Joseph, J.K., Virú, F.A., Shin, S.S., Furin, J.J., Becerra, M.C., Barry, D.J., Kim, J.Y., Bayona, J., Farmer, P., Fawzi, M.C.S. e Seung, K.J. (2004) Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *The lancet* **363**, 474-481.
- Nazarenko, I., Lowe, B., Darfler, M., Ikonomi, P., Schuster, D. e Rashtchian, A. (2002) *Nucleic Acids Research* **30**(9).
- Nieman, S., Richter, E., Rusch-Gerdes, S., Schlaak, M. e Grunert, U. (2000) Double Infection with a Resistant and a Multidrug-Resistant strain of a *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infections Diseases* **5**(6), 548-551.

- Patnaik, M., Liegmann, K. e Peter, J.B. (2001) Rapid detection os Smear-Negative *Mycobacterium tuberculosis* by PCR and sequencing for rifampin resistance with DNA extracted diretly from slides. *Journal of Clinical Microbiology* 39(1), 51-52.
- Piatek, A.S., Telenti, A., Murray, M.R., Jacobs, W.R., Kramer, F.R. e Alland, D. (2000) Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons implications for rapid susceptibility test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(1), 103-110.
- Piatek, A.S., Tyagi, S., Pol, A.C., Telenti, A., Miller, L.P., Kramer, F.R. e Alland, D. (1998) Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Biotechnology* 16, 359-363.
- Pina, J. (2000) A Tuberculose na Viragem do Milénio. Lidel.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S.H., Field, S.L., Bell, S.M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A.J., Robinson, P.A., Inglehearn, C.F., Isaacs, J. e Markham, A.F. (2003) Real-time PCR based on SYBR Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3(18).
- Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose, Sistema de Vigilância (2003) Ponto da situação epidemiológica e de desempenho.  
<http://www.dgsaude.pt/upload/membro.id/ficheiros/i006111.pdf>
- Pym, A.S., Domenech, P., Honoré, N., Song, J., Deretic, V. e Cole, S.T. (2001) Regulation of catalase-peroxidase (*KatG*) expression, isoniazid sensitivity and virulence by *furA* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* 40(4), 879-889.

- Ramachandran, R. e Paramasivan, C.N. (2002) What is new in the diagnosis of tuberculosis? Part II: Techniques for drug susceptibility testing. Indian Council of Medical Research Bulletin **32** (9).
- Ramaswamy, S.V. e Musser, J.M. (1998) Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*:1998 update. Tubercle and lung Disease **79**(1), 3-29.
- Ramaswamy, S.V., Reich, R., Dou, S.J., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A., Quitugua, T. e Graviss, E.A. (2003) Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47** (4), 1241-1250.
- Rattan, A., Kalia, A. e Ahmad, N. (1998) Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. Emerging Infectious Diseases **4**(2), 195-209.
- Rhee, J.T., Piatek, A.S., Small, P.M., Harris, L.M., Chaparro, S.V., Kramer, F.R. e Alland, A. (1999) Molecular epidemiologic evaluation of transmissibility and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology **37**(6), 1764-1770.
- Rinder, H., Thomschke, A., Rusch-Gerdes, S., Bretzel, G., Feldmann, K., Rifai, M. e Loscher, T. (1998) Significance of *ahpC* Promotor Mutations for the Prediction of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **17**, 508-511.
- Rossetti, M.L.R., Valim, A.R.M., Silva, M.S.N. e Rodrigues, V.S. (2002) Tuberculose resistente: revisão molecular. Ver Saúde Pública **36**(4), 525-532.
- Rouse, D.A., Li, Z., Bai, G. e Morris, S.L. (1995) Characterization of the *katG* and *inhA* Genes of Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **39** (11), 2472-2477.

- Sachan, A.S., Gupta, R.K., Katoch, V.M., Mishra, K. e Jakhmola, P. (2002) Detection of rifampin resistant mutant gene in *Mycobacterium tuberculosis* by line probe assay. *Indian Journal of Tuberculosis* **49**, 209.
- Saint-Joanis, B., Souchon, H., Wilming, M., Johnsson, K., Alzari, P.M., Cole, S.T. (1999) Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* **338**, 753-760.
- Sajduda, A., Brzostek, A., Poplawska, M., Augustynowics-Kopec, E., Zwolska, Z., Niamann, S., Dziadek, J. e Hillemann, D. (2004) Molecular characterization of rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(6), 2425-2431.
- Silva, M.S., Senna, S.G., Ribeiro, M.O., Valim, A.R., Telles, M.A., Kristski, A., Morlock, G.P., Cooksey, R.C., Zaha, A. e Rossetti, M.L. (2003) Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(9), 4471-4472.
- Somoskovi, A., Parsons, L.M. e Salfinger, M. (2001) The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory Research* **2**, 164-168.
- Sooligen, D., Haas, P.E.W., Doorn, H.R., Kuijper, E., Rinder, H. e Borgdorff, M. (2000) Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *The Journal of Infectious Diseases* **182**, 1788-90.

- Sreevatsan, S., Pan, X., Zhang, Y., Deretic, V. e Musser, J.M. (1997) Analysis of the oxyR-ahpC region in isoniazid resistant and susceptible Mycobacterium tuberculosis complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**(3), 600-606.
- Tan, L., Brisson, M., Park, R. e Hamby, K. (2000) Real-Time PCR/Melt-Curve Analysis: SNP Detection with FRET. Bio-Rad Laboratories Tech Note 2705.
- Telenti, A., Honoré, N., Bernasconi, C., March, J., Ortega, A., Heym, B., Takiff, H.E. e Cole, S.T. (1997) Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *Journal of Clinical Microbiology* **35**(3), 719-723.
- Torres, M.J., Criado, A., Ruiz, M., Llanos, A., Palomares, J.C. e Aznar, J.(2003) Improved real-time PCR for detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **45**, 207-212.
- Vandesompele, J., Paepe, A. e Speleman, F. (2002) Elimination of Primer-Dimer artifacts and Genomic Coamplification Using a Two-Step SYBR Green I Real-Time PCR. *Analytical Biochemistry* **303**, 95-98.
- Viedma, G. (2003) Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. *Clinical Microbiology and Infection* **9**, 349-359.
- Viedma, D.G., Infantes, M.S.D., Lasala, F., Chaves, F., Alcalá, L. e Bouza, E. (2002) New Real time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **40** (3), 988-995.

- Viveiros, M., Portugal, I., Bettencourt, R., Victor, T.C., Jordaan, A.M., Leandro, C., Ordway, D. e Amaral, L. (2002) Isoniazid-induced transient high-level resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46** (9): 2804-2810.
- Wayne, L.G. e Kubica, G.P. (1986) Genus *Mycobacterium*. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. e Holt J. G. (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2, pp 1436-1457. Baltimore Williams e Wilkins.
- Wei, C., Lei, B., Musser, J.M. e Tu, S. (2003) Isoniazid Activation defects in recombinant *Mycobacterium tuberculosis* catalase (*KatG*) mutants evident in *InhA* inhibitor production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**(2), 670-675.
- Wengenack, N.L. e Rusnak, F. (2001) Evidence for isoniazid-dependent free radical generation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* *KatG* and the isoniazid-resistant mutant *KatG*(S315T). *Biochemistry* **40**, 8990-8996.
- Wengenack, N.L., Todorovic, S., Yu, L. e Rusnak, F. (1998) Evidence for differential binding of isoniazid by *Mycobacterium tuberculosis* *katG* and the isoniazid-resistant mutant *katG* (S315T). *Biochemistry* **35**, 15825-15834.
- Whitney, J.B. e Wainberg, M.A. (2002) Isoniazid, the frontline of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *McGill Journal of Medicine* **6**, 114-123.
- Wilson, M., Derisi, J., Kristensen, H., Imboden, P., Rane, S., Brown, P.O. e Schoolnik, G.K. (1999) Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(22), 12833-12838.
- Woods, G.L., Brown-Elliott, B.A., Desmond, E.P., Hall, G.S., Heifets, L., Pfyffer, G.E., Ridderhof, J.C., Wallace, R.J., Warren, N.G. and Witebsky, F.G. (2003)

Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. NCCLS Document M24-A 23 (18).

World Health Organization (1997) Guidelines for the management of drug resistant tuberculosis.

World Health Organization / International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (1997) Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Communicable Diseases, Prevalence and Trends. The World Health Organization / International Union Against Tuberculosis and Lung Disease global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance.

World Health Organization / International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (2000) Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Communicable Diseases, Prevalence and Trends, report n°2. The World Health Organization / International Union Against Tuberculosis and Lung Disease global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance.

World Health Organization (2003) Surveillance of Tuberculosis in Europe – Euro TB. Report on tuberculosis cases notified in 2001.

World Health Organization (2003) Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis, Second Edition.

Zanden, A.G.M., Koppele-Vije, E.M., Bhanu, N.V., Soolingen, D.V. e Schouls, L.M. (2003) Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(3), 1101-1108.