



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**DINÂMICA FISIOLÓGICA E MUTACIONAL DA
MULTIRRESISTÊNCIA EM *Mycobacterium tuberculosis***

DIANA ISABEL OLIVEIRA MACHADO

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

Orientador: Professora Doutora Isabel Couto

Co-orientador: Professor Doutor Miguel Viveiros

Laboratório onde o trabalho experimental foi desenvolvido:

Unidade de Ensino e Investigação de Micobactérias

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

OUTUBRO DE 2009

Os resultados apresentados foram objecto de apresentação em co-autoria da seguinte comunicação em congresso sob a forma de Poster:

Machado, D., I. Couto, L. Amaral and M. Viveiros. Mutational adaptation in *Mycobacterium tuberculosis*: the emergence of multidrug resistance. Aceite para apresentação no Congresso Nacional de Microbiologia, MicroBiotec09, Vilamoura, Portugal. Novembro 2009.

Agradecimentos

Professora Doutora Isabel Couto, pela orientação, pelo apoio, pela amizade, pela companhia e pela confiança.

Professor Doutor Miguel Viveiros, pela co-orientação deste trabalho, pelas discussões, pela confiança e oportunidade. Pensamento abstracto...

Professor Doutor Leonard Amaral, pela oportunidade que me concedeu em integrar o grupo de trabalho da Unidade de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Marta Martins, pelo apoio, pela companhia, pelo estímulo e coragem, pelas conversas e desabafos, pelas discussões e principalmente pela grande amizade.

Sofia Costa, pela amizade, pelo apoio, pela disposição para ajudar. É espantoso como nunca estamos de acordo...

Liliana Rodrigues, pela amizade, apoio e pela companhia. Obrigada pelo desenho dos “primers” utilizados no qRT-PCR.

Jorge Ramos, pelo apoio e companhia. Obrigada pelo desenho dos “tubos” utilizados nos esquemas de adaptação e taxas de mutação.

Ana Martins pela amizade, apoio, disposição para ajudar e pela companhia.

Gabriella, Pedro, Susana, pelo convívio, pelo bom ambiente de trabalho, pelo apoio e ajuda no desenvolvimento do trabalho e por, de algum modo, contribuírem para a minha formação.

Dra. Josefina Almeida, por me ter incutido o “bichinho”, por ter partilhado o seu conhecimento, experiência e conselhos, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Professor Doutor João Piedade, Professor Doutor Ricardo Parreira e Professora Doutora Aida Esteves (UEI Virologia) pelo apoio, pela amizade e pelo convívio.

Professora Doutora Filomena Pereira, Professora Doutora Rita Castro e Doutora Emília Prieto (UEI Doenças Sexualmente Transmissíveis) pelo apoio, pela amizade e pelo convívio.

Professora Doutora Teresa Almada (Universidade Lusófona) pelo apoio na determinação das taxas de mutação.

D. Teresa, D. Fernanda e D. Cidália, por todo o apoio e amizade.

Sónia e Inês. Por estarem presentes sempre que preciso. Obrigada pelos bons momentos que vivemos.

Aos meus amigos, Vasco, Luís (Flautas), Gonçalo, Nuno, Bruno, Gil, Vítor, Zé, Vera e Elsa, por me aturarem nos bons e maus momentos. Apesar de estar ausente não estão esquecidos...

Aos meus pais, pelo apoio, compreensão e paciência que foram bastante importantes para chegar até aqui.

À minha sobrinha Fabiana, por existir... e pela alegria que me dá.

Ao meu irmão, Joel e à minha cunhada, Natália, pela confiança, compreensão e ajuda incondicional sem a qual este trabalho não teria sido possível. Este trabalho é-vos dedicado.

A todos que directa ou indirectamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho, e que não foram citados por falha minha.

Resumo

A tuberculose multirresistente é causada por estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à isoniazida e rifampicina, os dois principais antibacilares. Neste trabalho pretendemos compreender qual(is) o(s) mecanismo(s) que leva(m) ao desenvolvimento da multirresistência, expondo a estirpe de referência *M. tuberculosis* H37Rv e a estirpe clínica monorresistente à rifampicina 359/03 a concentrações constantes de isoniazida e rifampicina. As culturas iniciais e adaptadas foram caracterizadas fenotipicamente em termos de tempos de crescimento, testes de susceptibilidade e determinação de concentrações mínimas inibitórias, na ausência ou presença de inibidores de bombas de efluxo. A caracterização genotípica incidiu na pesquisa de eventuais alterações em zonas específicas dos genes *katG*, *inhA* e *rpoB*, por PCR e hibridação reversa e na quantificação da expressão dos genes de cinco bombas de efluxo por qRT-PCR.

A análise comparativa das culturas iniciais e das culturas adaptadas a 0.1 µg/ml de isoniazida, revelou que, após 3 semanas de exposição à isoniazida, a cultura H37Rv tornou-se resistente a este antibiótico, sendo este fenótipo revertido pelo inibidor de bombas de efluxo verapamil. A análise por qRT-PCR desta cultura revelou a sobreexpressão de todos os genes de bombas de efluxo analisados. A cultura de H37Rv obtida no final do processo de adaptação mantém-se resistente à isoniazida, apresentando uma deleção no gene *katG*. Com a exposição à isoniazida, a estirpe 359/03 tornou-se multirresistente. Novamente, este fenótipo é revertido pelo verapamil. A análise por qRT-PCR revelou a sobreexpressão de todos os genes de bombas de efluxo analisados, não tendo sido detectadas alterações nos outros alvos genéticos testados. Em relação à exposição das estirpes H37Rv e 359/03 a 1 µg/ml de rifampicina, não se verificaram alterações significativas, quer a nível fenotípico, quer a nível genotípico.

Os resultados obtidos ilustram *in vitro* diferentes estratégias através das quais *M. tuberculosis* pode responder quando exposto às concentrações clinicamente relevantes de um dado antibiótico e que podem resultar na emergência da multirresistência

Abstract

Multidrug resistant tuberculosis is caused by *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to both isoniazid and rifampicin, the main antibacillary used in tuberculosis therapy. In this work we intended to understand the mechanism(s) by which multiresistance develops, exposing the *M. tuberculosis* H37Rv reference strain and the clinical strain monoresistant to rifampicin 359/03 to constant concentrations of isoniazid and rifampicin. The initial and antibiotic-adapted cultures were phenotypically characterized in terms of growth period, antibiotic susceptibility testing and minimum inhibitory concentration determination in the presence or absence of efflux pump inhibitor. Genotypic characterization included analysis of specific regions of the *katG*, *inhA* and *rpoB* genes by PCR and reverse hybridization protocols and evaluation of expression level of genes coding for five efflux pumps by qRT-PCR.

Comparison of the initial and the cultures exposed to 0.1 µg/ml of isoniazid showed that after 3 weeks exposition to isoniazid, the H37Rv culture became resistant to the antibiotic, a phenotype reversed by the efflux pump inhibitor verapamil. qRT-PCR of this culture detected over-expression of all efflux pump genes tested. The culture obtained at the end of the isoniazid exposure process, was resistant to isoniazid, presenting a deletion in the *katG* gene. When strain 359/03 was exposed to isoniazid, it became multiresistant. Again, this phenotype is reverted by verapamil. qRT-PCR analysis of this culture detected over-expression of all efflux pump genes tested, with no alterations detected in the other genotypic targets screened. No significant alterations were detected when H37Rv and 359/03 strains were exposed to 1 µg/ml rifampicin, both in terms of phenotypic and genotypic characterization.

Overall, these results illustrate *in vitro* different strategies by which *M. tuberculosis* strains respond when exposed to clinically relevant concentrations of a given antibiotic, all of which may ultimately result in the emergence of multiresistance.

Índice Geral

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSO	i
AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1. Introdução	1
1.1 O género <i>Mycobacterium</i>	2
1.1.1 Características gerais	3
1.1.2 Invólucro celular	3
1.1.3 Características de crescimento	4
1.2 O complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.3 Patogénese da tuberculose	6
1.4 Diagnóstico laboratorial da tuberculose	9
1.4.1 Métodos convencionais de diagnóstico laboratorial	9
1.4.2 Métodos moleculares de diagnóstico laboratorial	11
1.5 Testes de susceptibilidade aos antibacilares	13
1.6 Terapêutica tuberculostática	13
1.7 A emergência da multirresistência	16
1.7.1 Base genética da resistência aos antibacilares em <i>M. tuberculosis</i>	17
1.7.1.1 Mecanismos de resistência à estreptomicina	18
1.7.1.2 Mecanismos de resistência ao etambutol	19
1.7.1.3 Mecanismos de resistência à pirazinamida	20
1.7.1.4 Mecanismos de resistência à isoniazida	21
1.7.1.4.1 O gene <i>katG</i>	23
1.7.1.4.2 O gene <i>inhA</i>	24
1.7.1.4.3 O gene <i>kasA</i>	25

1.7.1.4.4 O gene <i>ahpC</i> e região intragénica <i>oxyR-aphC</i>	25
1.7.1.4.5 O gene <i>ndh</i>	25
1.7.1.5 Mecanismos de resistência à rifampicina	26
1.7.2 Taxas de mutação e custo biológico associado à aquisição de mutações	28
1.7.3 Resistência intrínseca: o contributo das bombas de efluxo na resistência em <i>M. tuberculosis</i>	30
1.8 Objectivos desta Dissertação	35
2. Material e Métodos	37
2.1 Material	37
2.1.1 Material biológico	37
2.1.2 Outro material biológico	38
2.1.3 Meios de cultura, soluções e enzimas	40
2.2 Métodos	45
2.2.1 Crescimento das estirpes	46
2.2.1.1 Sistema BACTEC™ MGIT™ 960	46
2.2.1.2 Sistema BACTEC 460-TB	47
2.2.2 Coloração de Ziehl - Neelsen e controlo de contaminação	49
2.2.3 Manutenção das estirpes	49
2.2.4 Caracterização fenotípica das estirpes em estudo	50
2.2.4.1 Teste de susceptibilidade aos antibacilares	50
2.2.4.2 Teste de susceptibilidade aos antibacilares na presença de inibidores de bombas de efluxo	53
2.2.4.3 Determinação de concentrações mínimas inibitórias	53
2.2.4.3.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias, para a isoniazida e rifampicina, com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960	53
2.2.4.3.2 Determinação de concentrações mínimas inibitórias, para a isoniazida e rifampicina, com o sistema BACTEC 460-TB	54
2.2.4.3.3 Determinação de concentrações mínimas inibitórias para inibidores de bombas de efluxo	55
2.2.4.3.4 Determinação de concentrações mínimas inibitórias na presença de inibidores de bombas de efluxo	56

2.2.4.4 Teste de tolerância ao calor para a detecção da actividade da catalase nas estirpes em estudo	56
2.2.5 Caracterização genotípica das estirpes em estudo	57
2.2.5.1 O sistema de sondas <i>Accuprobe</i>	57
2.2.5.2 Sistemas de identificação e rastreio de mutações baseados na amplificação de ácidos nucleicos	59
2.2.5.2.1 Extração de DNA genómico	59
2.2.5.2.2 O teste GenoType MTBC	59
2.2.5.2.3 O teste INNOLiPA Rif. TB	61
2.2.5.2.4 O teste GenoType MTBDR _{plus}	65
2.2.5.3 Detecção de mutações no gene <i>katG</i>	66
2.2.6 Extração de RNA	67
2.2.7 Quantificação da expressão de genes que codificam para bombas de efluxo por qRT-PCR	67
2.2.8 Processo de adaptação das estirpes H37Rv e 359/03 a concentrações constantes de isoniazida e rifampicina	69
2.2.8.1 Processo de adaptação à rifampicina	70
2.2.8.2 Processo de adaptação à isoniazida	70
2.2.9 Aplicação do “software” Epicenter/TB eXIST para o sistema BACTEC TM MGIT TM 960	71
2.2.10 Determinação de taxas de mutação	72
3. Resultados	77
3.1 Processo de adaptação aos antibacilares isoniazida e rifampicina	77
3.1.1 Adaptação a 0,1 µg/ml de isoniazida	78
3.1.2 Adaptação a 1 µg/ml de rifampicina	79
3.2 Caracterização fenotípica das estirpes H37Rv e 359/03, originais e adaptadas	81
3.2.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI _s)	82
3.2.1.1 Evolução do processo de adaptação da estirpe H37Rv	84
3.2.1.2 Evolução do processo de adaptação da estirpe 359/03	87
3.2.2 Teste de susceptibilidade aos antibacilares	91

3.2.3 Teste de tolerância ao calor para a detecção da actividade da catalase nas estirpes em estudo	91
3.3 Caracterização genotípica das estirpes H37Rv e 359/03, originais e adaptadas	93
3.4 Efeito de compostos inibidores de bombas de efluxo na susceptibilidade à isoniazida	98
3.5 Quantificação da expressão de genes que codificam para bombas de efluxo por qRT-PCR	101
3.6 Determinação de taxas de mutação	105
4. Discussão e Conclusões	107
5. Referências Bibliográficas	119

Índice de Figuras

Figura 1. Observação microscópica e macroscópica de <i>M. tuberculosis</i>	6
Figura 2. Sequência de eventos importantes na infecção por <i>M. tuberculosis</i>	7
Figura 3. Análise esquemática do desenvolvimento da resistência em <i>M. tuberculosis</i>	16
Figura 4. Mecanismo proposto para o modo de acção da isoniazida	23
Figura 5. Representação esquemática de algumas das mutações associadas à resistência à rifampicina em <i>M. tuberculosis</i> na RRDR	27
Figura 6. Representação esquemática da região relevante de resistência à rifampicina no gene <i>rpoB</i>	62
Figura 7. Representação esquemática das diferentes sondas presentes na tira de nitrocelulose do sistema de detecção INNOLiPA Rif. TB	63
Figura 8. Representação esquemática do processo de adaptação à rifampicina	70
Figura 9. Representação esquemática do processo de adaptação à isoniazida	71
Figura 10. Representação esquemática do procedimento seguido para a determinação de taxas de mutação	75
Figura 11. Evolução do processo de adaptação da estirpe H37Rv a uma concentração constante de INH	78
Figura 12. Evolução do processo de adaptação da estirpe 359/03 a uma concentração constante de INH	79
Figura 13. Evolução do processo de adaptação da estirpe H37Rv a uma concentração constante de RIF	80
Figura 14. Evolução do processo de adaptação da estirpe 359/03 a uma concentração constante de RIF	81
Figura 15. Ilustração do critério utilizado para interpretação de resultados na determinação de CMI's realizadas com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 e o “software” Epicenter TB-eXIST	83
Figura 16. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas H37Rv resultantes da adaptação a 0,1 µg/ml de isoniazida e a 1 µg/ml de rifampicina	87

Figura 17. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas 359/03 resultantes da adaptação a 0,1 µg/ml de isoniazida	90
Figura 18. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas 359/03 resultantes da adaptação a 1 µg/ml de rifampicina	90
Figura 19. Pesquisa de mutações em genes envolvidos na resistência à rifamicina e isoniazida utilizando o sistema Genotype MTBDR <i>plus</i>	97
Figura 20. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de parte do gene <i>katG</i> por PCR	98
Figura 21. Teste de susceptibilidade da cultura 359/03 INH 1#33 para a isoniazida na presença de tioridazina	101
Figura 22. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas H37Rv resultantes da adaptação a 0,1 µg/ml de isoniazida e respectiva caracterização genética	103
Figura 23. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas H37Rv resultantes da adaptação a 1 µg/ml de rifampicina	103
Figura 24. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas 359/03 resultantes da adaptação a 0,1 µg/ml de isoniazida e respectiva caracterização genética	104
Figura 25. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas 359/03 resultantes da adaptação a 1 µg/ml de rifampicina	104

Índice de Tabelas

Tabela 1. Populações bacilares e fármacos antibacilares	14
Tabela 2. Genes que codificam para possíveis bombas de efluxo associados a resistência à isoniazida e rifampicina em <i>M. tuberculosis</i>	33
Tabela 3. Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados para a amplificação por PCR dos genes em estudo e tamanho esperado de cada fragmento	39
Tabela 4. Composição dos meios de cultura utilizados	41
Tabela 5. Composição dos suplementos de crescimento utilizados	42
Tabela 6. Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizadas nos testes de susceptibilidade e no processo de adaptação	43
Tabela 7. Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizadas na determinação de concentrações mínimas inibitórias	43
Tabela 8. Composição e modo de preparação das soluções de inibidores de bombas de efluxo utilizadas	44
Tabela 9. Composição e modo de preparação das soluções utilizadas no teste da catalase	44
Tabela 10. Composição e modo de preparação de soluções tampão utilizadas	44
Tabela 11. Enzimas utilizadas	45
Tabela 12. Soluções de corantes utilizadas	45
Tabela 13. Concentrações críticas utilizadas para os testes de susceptibilidade aos antibacilares de primeira linha	51
Tabela 14. Mutações no gene <i>rpoB</i> e as sondas “wild type” e de mutação correspondentes detectadas pelo sistema MTBDR _{plus}	65
Tabela 15. Mutações no gene <i>katG</i> e as sondas “wild type” e de mutação correspondentes detectadas pelo sistema MTBDR _{plus}	65
Tabela 16. Mutações na região promotora do gene <i>inhA</i> e as sondas “wild type” e de mutação correspondentes detectadas pelo sistema MTBDR _{plus}	66

Tabela 17. Valores de CMI para a isoniazida referentes às culturas H37Rv adaptadas à isoniazida	85
Tabela 18. Valores de CMI para a rifampicina referentes às culturas H37Rv adaptadas à isoniazida	85
Tabela 19. Valores de CMI para a isoniazida e rifampicina referentes às culturas H37Rv adaptadas à rifampicina	86
Tabela 20. Valores de CMI para a isoniazida das culturas 359/03 adaptadas à isoniazida	88
Tabela 21. Valores de CMI para a rifampicina das culturas 359/03 adaptadas à isoniazida	88
Tabela 22. Valores de CMI para a rifampicina das culturas 359/03 adaptadas à rifampicina	89
Tabela 23. Valores de CMI para a isoniazida das culturas 359/03 adaptadas à rifampicina	89
Tabela 24. Testes de susceptibilidade aos cinco antibacilares de primeira linha das culturas originais e adaptadas à isoniazida e rifampicina	91
Tabela 25. Análise da actividade da catalase das estirpes em estudo	92
Tabela 26. Caracterização genotípica das culturas H37Rv, original e adaptadas à isoniazida e à rifampicina	94
Tabela 27. Caracterização genotípica das culturas 359/03, original e adaptadas à isoniazida e à rifampicina	95
Tabela 28. Valores de CMI para a isoniazida referente às culturas originais e adaptadas, na presença de compostos inibidores de bombas de efluxo	99
Tabela 29. Perfil de susceptibilidade na presença e ausência de compostos inibidores de bombas de efluxo	100
Tabela 30. Níveis de expressão dos genes que codificam para bombas de efluxo em <i>M. tuberculosis</i> na cultura H37Rv INH 1#2, em relação à sua expressão na estirpe original H37Rv	102
Tabela 31. Níveis de expressão dos genes que codificam para bombas de efluxo em <i>M. tuberculosis</i> na cultura 359/03 INH 1#33, em relação à sua expressão na estirpe original 359/03	102

Tabela 32. Aplicação do teste de flutuação à estirpe H37Rv para determinação da frequência e taxa de mutação para a isoniazida	105
Tabela 33. Aplicação do teste de flutuação à estirpe 359/03 para determinação da frequência e taxa de mutação para a isoniazida	106

Lista de Abreviaturas

A	Alanina
ABC	“Adenosin Triphosphate (ATP) -Binding Cassete”
C	Cisteina
AS	Espécies Adicionais, do inglês “Additional Species”
ATCC	“American Type Culture Collection” (Virginia, EUA)
ATP	Trifosfato de Adenosina
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido-Resistentes
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCIP/NBT	Bromo-4-Chloro-3-Indolil-Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium
BE	Brometo de etídeo
C¹⁴	Carbono 14
CDC	“Center for Disease Control and Prevention” (EUA)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CIP	Ciprofloxacina
CFU	Unidade (s) Formadora (s) de Colónia (s), do inglês “ Colony Forming Units”
CM	Micobactérias Comuns, do inglês “Common Mycobacteria”
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CO₂	Dióxido de Carbono
CPZ	Clorpromazina
D	Ácido aspártico
D.O.	Densidade Óptica
DGS	Direcção Geral de Saúde
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”
dNTP	Desoxirribonucleotido (s)
C_q	“Quantification Threshold”
EUA	Estados Unidos da América
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
E-MTD	“Enhanced <i>M. tuberculosis</i> Direct Test”

EPI	Inibidor de bombas de efluxo, do inglês “Efflux pump inhibitor”
ERDR	Região Determinante de Resistência ao Etambutol, do inglês “Ethambutol Resistance Determining Region”
EMB	Etambutol
eXist	“eXtended Individual Susceptibility Testing”
F	Fenilalanina
FASI	Sintetase de ácidos gordos I, do inglês “Fatty Acid Synthase type I”
FASII	Sintetase de ácidos gordos II, do inglês “Fatty Acid Synthase type II”
FDA	“Food and Drug Administration” (EUA)
Fw	“Forward”
g	Gramma
G	Glutamato
GI	Índice de Crescimento, do inglês “Growth Index”
GU	Unidades de Crescimento, do inglês “Growth Units”
H	Histidina
H₂O₂	Peróxido de Hidrogénio
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês “Human Immunodeficiency Virus”
HPA	Ensaio de Hibridação Protegida, do inglês “Hybridization Protection Assay”
I	Isoleucina
INH	Isoniazida
IP	“Primers” internos, do inglês, “Inner Primers”
L	Leucina
LJ	Lowenstein-Jensen
MATE	“Multidrug And Toxic Compound Extrusion”
MB	Middlebrook
MDRTB	Tuberculose Multirresistente, do inglês “Multidrug-Drug Resistant Tuberculosis”
MFS	“Major Facilitator Superfamily”
MgCl₂	Cloreto de Magnésio

MGIT	“Mycobacterial Growth Indicator Tube”
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milimetro
MmpL	“Mycobacterial Membrane Protein Large”
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , do inglês “ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex”
MTBDR	“ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Drug Resistant”
Mut	Mutação
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido, do inglês “Nicotinamide Adenine Dinucleotide”
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidrogenase, do inglês “Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogenase”
NAP	p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxi-propionofenona
NCBI	“National Center for Biotechnology Information” (EUA)
O₂	Oxigénio
OADC	Ácido Oleico; Albumina; Dextrose; Catalase
OFL	Ofloxacina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OP	“Primers” externos, do inglês “Outer Primers”
PANTA	Polimixina B; Anfotericina B; Ácido Nalidixico; Trimetropim; Azlocilina
pb	par(es) de bases
PCR	Reacção em Cadeia da Polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”
PNM	Mistura de “primers” e nucleótidos, do inglês “Primer and Nucleotide Mixture”
POA	Ácido pirazinóico, do inglês “Pyrazinoic Acid”
POES	“Polyoxyethylene stearate”

PZA	Pirazinamida
Q	Glutamina
qRT-PCR	PCR Quantitativo em Tempo Real, do inglês “Real Time Quantitative RT-PCR
R	Arginina
RD1	Região de Diferença 1
RES	Reserpina
RIF	Rifampicina
RLU	Unidades Relativas de Luz, do inglês “Relative Light Units”
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês “Ribonucleic Acid”
RND	“Resistance Nodulation Division”
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RT	Transcrição Reversa, do inglês “Reverse Transcription”
Rv	“Reverse”
S	Serina
SIRE	Streptomycin; Isoniazid; Rifampicin; Ethambutol
SMR	“Small Multidrug Resistance”
STR	Estreptomicina, do inglês “Streptomycin”
T	Treonina
TAE	Tampão Tris/Ácido acético/EDTA
TB	Tuberculose
TE	Tampão Tris-HCl/EDTA
TET	Tetraciclina
THC	Ácido tiofeno-2-carboxílico
Tris-HCl	Tris (Hidroximetil) aminometano
TTD	Tempo para a Detecção, do inglês “Time To Detection”
TZ	Tioridazina
UV	Ultravioleta
V	Valina
VP	Verapamil
WT	Tipo Selvagem, do inglês “Wild Type”

XDRTB	Tuberculose extensivamente resistente, do inglês “extensively drug resistant tuberculosis”
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar

1.Introdução

A Tuberculose é uma das doenças infecciosas mais antigas. Com registos que datam desde a revolução Neolítica (8000-6000 B.C.) (60) o seu agente etiológico, *Mycobacterium tuberculosis*, é responsável por uma das mais elevadas taxas de mortalidade devida a um só agente infeccioso (115).

Designada por Hipócrates como *phthisis*, consumpção, nome pela qual foi conhecida até ao início do século XX, a tuberculose atingiu proporções pandémicas na Europa e América do Norte no final do século XVIII e na primeira metade do século XIX, tendo causado a morte de milhões de pessoas. Durante o século XIX e início do século XX, *M. tuberculosis* continuou a ser responsável por diversas epidemias de tuberculose. A melhoria das condições de vida e a implementação da terapêutica tuberculostática levaram a que, em meados do século XX, a incidência da tuberculose tivesse diminuído nos países industrializados (32,60).

No entanto, no final desse mesmo século, a incidência da tuberculose voltou a aumentar, levando a que, em 1993, fosse declarada uma emergência global pela Organização Mundial de Saúde (OMS), reconhecendo assim a sua importância crescente como um problema de saúde pública (109). Actualmente, segundo a OMS, cerca de dois biliões de pessoas, *i.e.*, um terço da população mundial, estão infectadas com *M. tuberculosis*, existindo cerca de 9 milhões de novos casos de tuberculose pulmonar e 2 milhões de mortes por ano (115). A reemergência global da tuberculose está relacionada não só com a pobreza, o crescimento populacional, a migração populacional e o aumento da incidência do vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês “Human Immunodeficiency Virus”) em alguns países, mas também com o aumento do número de estirpes resistentes aos antibióticos de primeira linha e em particular, com a emergência de estirpes multirresistentes (111).

Em termos de saúde pública, a tuberculose multirresistente constitui uma ameaça crescente a nível mundial, assumindo os contornos de uma autêntica pandemia em algumas regiões do globo. Este facto representa um grave problema de saúde pública e

coloca-se como um obstáculo aos programas de controlo globais da tuberculose (114). A resistência aos antibióticos e em particular o tratamento de doentes com tuberculose multirresistente é hoje um desafio global. O não tratamento ou o tratamento incorrecto de doentes com tuberculose multirresistente constitui uma fonte permanente de transmissão de estirpes resistentes (42). Para além disso, a recém descrita tuberculose extensivamente resistente, resistente à maioria dos antibacilares de primeira linha e segunda linha, constitui uma ameaça adicional ao controlo da doença. Assim, torna-se importante conhecer melhor os mecanismos que levam ao desenvolvimento de resistência aos antibacilares, em particular da multirresistência, em *M. tuberculosis*. Este é o tema desta Dissertação, na qual se procuraram elucidar algumas das estratégias pelas quais esta bactéria é capaz de se adaptar aos dois antibacilares mais importantes; isoniazida e rifampicina, tornando-se assim multirresistente.

1.1 O género *Mycobacterium*

A designação *Mycobacterium* deriva da junção do grego *myces* (fungo) e *bakterion* (pequenos bacilos). O género *Mycobacterium* pertence à família Mycobacteriaceae (o único género desta família), ordem Actinomycetales e classe Actinomycetes e compreende actualmente 143 espécies e 11 subespécies. Atendendo à sua patogenicidade para o Homem, as micobactérias podem ser classificadas como: estritamente patogénicas, potencialmente patogénicas ou oportunistas e raramente patogénicas ou saprófitas (171,172).

Dentro do género *Mycobacterium*, as espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, ao complexo *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium leprae* são as mais conhecidas.

1.1.1 Características gerais

Os membros do género *Mycobacterium* são bacilos finos, encurvados ou rectos, que se podem apresentar isolados, aos pares ou em grupo. Dependendo das condições de crescimento e idade das culturas, as células podem variar em tamanho e morfologia, desde pequenos cocobacilos a bacilos compridos. As células são aeróbias, imóveis e não formadoras de esporos. Possuem um elevado conteúdo em citosina e guanina (C + G) no seu ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês “Deoxyribonucleic Acid”), de 61% a 71% (83).

1.1.2 Invólucro celular

O invólucro celular das micobactérias é muito característico, uma vez que é extraordinariamente rico em lípidos, o que torna a sua superfície extremamente hidrofóbica. O invólucro é composto por uma membrana plasmática, rodeada pela parede celular (16), que alguns autores advogaram recentemente ser rodeada por uma membrana externa (201) A parede celular é constituída por uma camada interna de peptidoglicano covalentemente ligado a um polissacárido ramificado, o arabinogalactano. O arabinogalactano possui as extremidades esterificadas com ácidos gordos de elevada densidade, os ácidos micólicos. Os ácidos micólicos são cadeias muito longas, α -alquil e β -hidroxilados, contendo 60 a 90 átomos de carbono. Para além dos ácidos micólicos, estão ainda associados ao invólucro celular outros lípidos, glicolípidos, lipopolissacáridos, sulfolípidos e outras proteínas. A composição da parede celular é em grande parte responsável pela capacidade apresentada pelas micobactérias de persistência no ambiente; resistência à desidratação e a agentes antimicrobianos; e a mecanismos de defesa imunológicos do hospedeiro (16).

Apesar da eventual existência de uma membrana externa, as micobactérias não se enquadram na classificação de Gram. Devido ao seu elevado conteúdo lipídico, são resistentes aos corantes comumente utilizados no método de coloração de Gram ou Giemsa. Apesar da coloração de Gram ser ineficaz neste grupo especial de

microrganismos, eles podem ser identificados pela sua álcool-ácido-resistência. Esta é a base teórica subjacente à técnica de coloração de Ziehl-Neelsen, desenvolvida por Paul Ehrlich em 1882 e mais tarde modificada por Ziehl e Neelsen (13), actualmente a mais utilizada em micobacteriologia. Esta propriedade deve-se à ligação estabelecida entre o corante básico e os ácidos micólicos, na presença de calor. Assim, as células tornam-se impermeáveis, o que lhes permite manter a coloração do corante básico quando são utilizadas soluções álcool-ácidas para a descoloração. Deste modo, os membros deste grupo são frequentemente designados por bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR). Esta característica, embora não seja exclusiva do género, é talvez a sua propriedade mais distintiva em termos de identificação laboratorial.

1.1.3 Características de crescimento

Com base na velocidade de crescimento em meio sólido e sob condições de temperatura e nutrientes adequadas, as micobactérias podem ser divididas em dois grupos: micobactérias de crescimento lento (tempo de crescimento superior a sete dias) e micobactérias de crescimento rápido (inferior a sete dias).

Runyon classificou as espécies de micobactérias em quatro grupos, com base nos tempos de crescimento e na produção, ou não, de pigmento. Os primeiros três grupos englobam as espécies de crescimento lento e distinguem-se pela produção de pigmento; grupo I: fotocromogéneas (produção de pigmento na presença de luz); II: escotocromogéneas (produção de pigmento constitutiva); e III: não cromogéneas. O grupo IV engloba as espécies de crescimento rápido (171). Apesar de ser universalmente aceite, esta classificação possui excepções, uma vez que algumas espécies parecem não se encaixar dentro dos grupos estabelecidos, no que se refere à sua cromogenicidade e tempos de crescimento. Actualmente, esta classificação é utilizada, quase exclusivamente, em contextos académicos uma vez que clinicamente é crucial uma identificação mais precisa ao nível de espécie, dando-se preferência aos métodos genotípicos de identificação. No entanto, as características de pigmentação e crescimento orientam a escolha dos testes genotípicos a utilizar e auxiliam na

confirmação dos resultados obtidos. Relativamente à gama de temperaturas óptimas de crescimento, estas variam entre 20°C e 52°C, dependendo da espécie (171,172).

1.2 O complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Isolado por Robert Koch em 1882, *M. tuberculosis*, ou bacilo de Koch, é o agente causal da tuberculose e elemento representativo de um complexo de espécies filogeneticamente relacionadas, que partilham mais de 99,9% de identidade entre as suas sequências nucleotídicas (161) e não diferem nas sequências do seu RNA ribossómico 16S (rRNA; RNA do inglês “Ribonucleic Acid”) (14). No entanto, as espécies incluídas no complexo *M. tuberculosis* diferem entre si no que se refere a aspectos morfológicos, características bioquímicas, gama de hospedeiros e padrão de doença em hospedeiros animais.

Classicamente, o complexo *M. tuberculosis* inclui quatro membros reconhecidos: *M. tuberculosis* e *Mycobacterium africanum*, que têm o Homem como único hospedeiro; *Mycobacterium bovis*, que possui uma vasta gama de hospedeiros, desde o homem até aos animais domésticos e selvagens e *Mycobacterium microti*, patógeno de pequenos roedores. As duas novas espécies recentemente adicionadas ao complexo são *Mycobacterium caprae*, patógeno de caprinos (5) e *Mycobacterium pinnipedii*, patógeno de animais marinhos (30). Em 1997 foi acrescentado ao complexo *M. tuberculosis* um outro membro, designado por “*Mycobacterium canetti*” (177) mas que, apesar de ser aceite pela comunidade científica, ainda não está oficialmente reconhecido. Por último, existem ainda descrições de variantes raras, por exemplo, o bacilo de “dassie” e o bacilo dos antílopes (100), mas a sua posição dentro do complexo não está ainda estabelecida.

Todos os membros dentro do complexo *M. tuberculosis* são microrganismos de crescimento lento, com tempo de geração de 12 a 24 horas. Uma característica importante, mas não propriedade exclusiva, do complexo *M. tuberculosis*, é a sua tendência para a formação de cordas ou “serpentinhas” em meio líquido. A base

bioquímica deste fenómeno, o dimicolato de trehalose, um ácido micólico, é designada por factor corda (8) (Figura 1a). Outra característica do complexo *M. tuberculosis* é o desenvolvimento de colónias rugosas (aspecto “couve-flor”) não cromogéneas, com excepção de “*M. canetti*”, em meio sólido (Figura 1b). Juntas, estas características fornecem um diagnóstico presuntivo para a identificação do complexo *M. tuberculosis*.

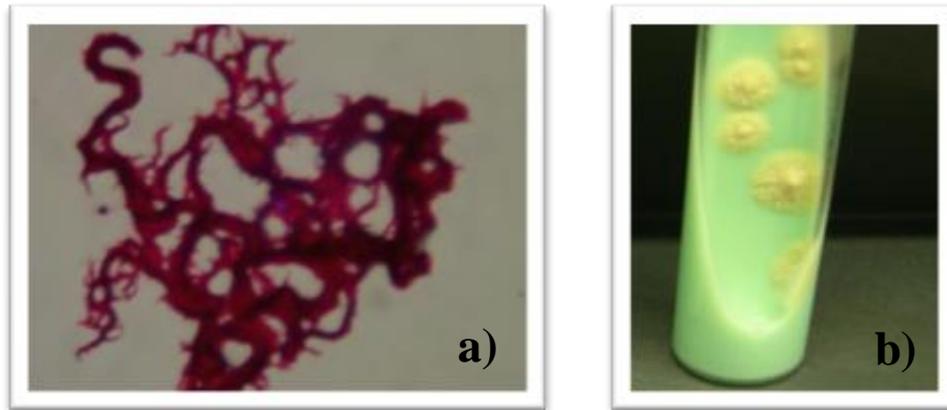


Figura 1. Observação microscópica e macroscópica de *M. tuberculosis*. a) Coloração Ziehl-Neelsen a partir de uma cultura crescida em meio líquido MGIT (1000X); b) desenvolvimento de colónias rugosas em meio de Lowenstein-Jensen.

1.3 Patogénese da tuberculose

Do ponto vista de saúde pública, a tuberculose pulmonar é a forma mais comum e a mais importante da doença causada por *M. tuberculosis*. A transmissão ocorre por inalação de aerossóis, que transportam partículas infecciosas, transmitidos por indivíduos bacilíferos (Figura 2).

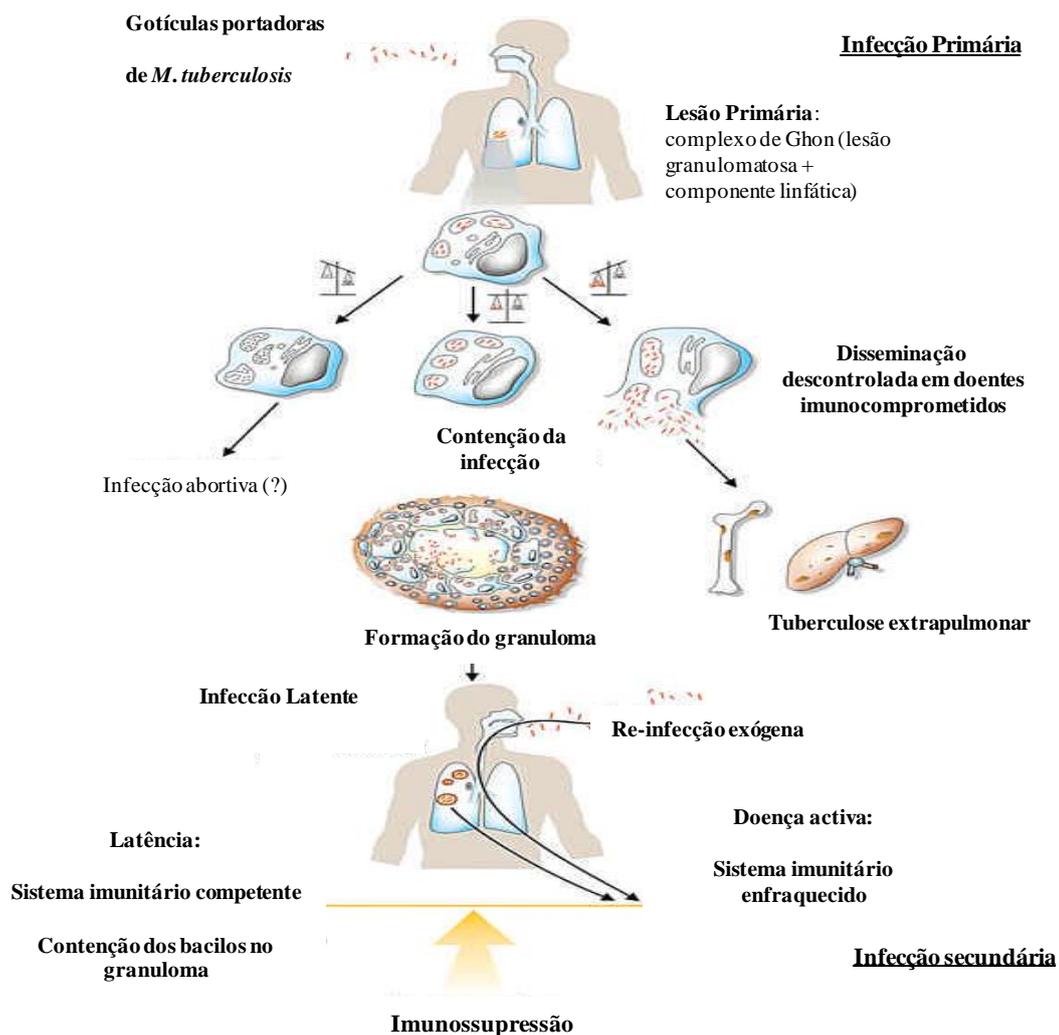


Figura 2. Sequência de eventos importantes na infecção por *M. tuberculosis* (adaptado de Ulrichs and Kaufmann, 2002 (174)).

A doença activa pode ocorrer logo após a infecção (infecção primária) ou mais tarde, após reactivação (infecção secundária). A probabilidade de a infecção evoluir para doença activa depende de factores ligados ao número de micobactérias presentes no inóculo, da sua capacidade de multiplicação e dos factores imunológicos e genéticos do hospedeiro. De um modo geral, estima-se que a infecção primária evolua para doença activa em apenas 10% dos indivíduos infectados (173).

Após a inalação, apenas as partículas mais pequenas conseguem ultrapassar a barreira mucociliar e alcançar os alvéolos pulmonares. Neste local, os bacilos irão ser fagocitados pelos macrófagos alveolares, as primeiras células a responder à infecção. A

destruição das bactérias depende da capacidade do macrófago para conter a infecção. Se o macrófago conseguir destruir os bacilos, a infecção é contida. No entanto, se o macrófago não for capaz de matar os bacilos, estes irão multiplicar-se intracelularmente, com consequente lise celular e disseminação (174).

De modo a circunscrever o processo infeccioso, os macrófagos irão induzir uma resposta pró-inflamatória local, originando uma lesão granulomatosa, o designado complexo de Ghon (175). A formação do granuloma resulta principalmente da acumulação de linfócitos e macrófagos activados (74), o que cria um microambiente que limita a replicação e a disseminação do bacilo (173). Este ambiente destrói os macrófagos e origina uma zona de necrose no centro da lesão, o *caseum* (foco caseoso sólido). Este é caracterizado por possuir baixos níveis de oxigénio, baixo pH e escassez de nutrientes (138), restringindo o crescimento bacilar e levando a infecção a persistir num estado latente (173,174) (Figura 2).

Em indivíduos imunocompetentes as lesões geralmente calcificam, controlando-se assim a infecção. No entanto, em indivíduos com o sistema imunitário enfraquecido, ocorre reactivação do granuloma e as lesões progridem para doença activa. Nestes, ocorre liquefacção do tecido necrótico formado, dando origem a cavidades ou cavernas. Estas cavernas fornecem um ambiente bastante oxigenado que favorece a proliferação dos bacilos, permitindo-lhes multiplicar-se dentro dos macrófagos inactivos presentes à superfície e por isso permissivos à multiplicação bacilar (173). Entre estes, poderão emergir populações discretas de bacilos com alterações genéticas que lhes conferem resistência aos antibióticos (74,94) (Figura 2).

O material proveniente das lesões tuberculosas contém um vasto número de bacilos e constitui um veículo para a propagação dos bacilos através da formação de aerossóis após a sua expulsão dos pulmões. Deste modo, os microrganismos podem ser transmitidos para outros indivíduos, dando-se início a um novo ciclo de infecção. Assim, o doente com lesão cavitária é a principal fonte de infecção e propagação da doença na comunidade.

1.4 Diagnóstico laboratorial da tuberculose

A principal prioridade dos programas de controlo da tuberculose assenta no diagnóstico rápido e correcto e no pronto tratamento de indivíduos com tuberculose activa. Com esta medida, pretende-se interromper a cadeia de transmissão do bacilo e proporcionar uma terapêutica adequada ao doente. Não descurando a importância da história e exame clínico do doente no estabelecimento da “suspeita clínica”, os exames radiológicos e laboratoriais têm um papel crucial na tomada de decisão terapêutica. Neste contexto, o laboratório de micobacteriologia possui um papel preponderante, uma vez que o diagnóstico definitivo da tuberculose continua a basear-se no isolamento e identificação do microrganismo infectante.

1.4.1 Métodos convencionais de diagnóstico laboratorial

M. tuberculosis pode ser isolado a partir de uma grande variedade de produtos biológicos tais como expectoração, secreções brônquicas, lavado broncoalveolar, suco gástrico, sangue, medula óssea, urina, líquido cefalo-raquidiano, pleural, peritoneal e pericárdico, bem como material proveniente de biópsias. A qualidade da amostra a analisar e a importância de se efectuar a colheita preferencialmente antes do início da terapêutica são factores determinantes para o sucesso do isolamento cultural de *M. tuberculosis*.

O diagnóstico laboratorial presuntivo de tuberculose pode ser estabelecido com base no exame directo a partir da amostra. A detecção de BAAR por microscopia é um método rápido, de simples execução e com elevada especificidade. No entanto, apresenta duas limitações: possui baixa sensibilidade e não permite a distinção entre as espécies de micobactérias (35). Os métodos de coloração mais utilizados incluem as colorações com fucsina fenicada, Ziehl-Neelsen (ver Introdução 1.1.2) e Kinyoun e colorações com um corante fluorescente, como a auramina O (155). É indispensável transmitir o resultado da microscopia assim que este esteja disponível, incluindo a sua classificação em termos

de número de bacilos observados (baciloscopia), uma vez que esta está directamente relacionada com o grau de infecciosidade e com a gravidade da doença. Assim, torna-se muito importante não só uma classificação qualitativa mas também uma classificação quantitativa do exame microscópico.

A cultura é o método de referência para a detecção de *M. tuberculosis* sendo, no entanto, um método dispendioso e lento, uma vez que este microrganismo não cresce nos meios de cultura habituais, sendo necessária a preparação de meios específicos. Mesmo nestes meios, é necessário esperar cerca de três a seis semanas até que sejam visíveis colónias de *M. tuberculosis*. Dentro dos meios de cultura sólidos utilizados para o crescimento de micobactérias, o meio de Lowenstein-Jensen (LJ), à base de ovo coagulado, é o mais utilizado. Em 1958, Middlebrook e Cohn descreveram um meio à base de agar que permite uma detecção mais rápida do crescimento micobacteriano (148). Actualmente, existem diferentes formulações dos meios Middlebrook (MB; 7H9, 7H10, 7H11, 7H12 e 7H13), tanto líquidos como gelosados e com aplicações distintas.

O tempo para a detecção de crescimento micobacteriano pode ser encurtado, utilizando-se sistemas automatizados de cultura em meio líquido, que proporcionam um diagnóstico laboratorial mais célere. Como exemplo, pode destacar-se o sistema BACTEC (Becton Dickinson, Sparks, MD), nas suas duas versões; o BACTEC™ 460-TB, um sistema radiométrico semi-automatizado desenvolvido com base no trabalho de Cummings *et al.*, e Middlebrook *et al.*, cujo meio utilizado, meio MB 7H12, inclui um substrato radioactivo, o ácido palmítico marcado com carbono 14 (C^{14}), que vai ser hidrolisado pela micobactéria, sendo o crescimento detectado através da medição do consumo de CO_2 radioactivo (145); e o sistema BACTEC™ MGIT™ 960, um sistema automatizado que utiliza tubos MGIT (MGIT; do inglês “Mycobacterial Growth Indicator Tube”), nos quais o crescimento é seguido por fluorimetria (148). A fluorescência gerada provém da redução de um fluorocromo, que se encontra na base do tubo, causada pelo consumo de oxigénio presente no meio, à medida que ocorre o crescimento bacteriano (ver Capítulo Materiais e Métodos).

Uma vez obtida a cultura, a fase seguinte do diagnóstico laboratorial consiste na identificação do bacilo. Classicamente, a identificação de *M. tuberculosis* baseia-se na observação de um conjunto de características fenotípicas (referidas anteriormente) e provas bioquímicas. Apenas para referir algumas, a identificação do complexo *M. tuberculosis* centra-se em propriedades como a produção e acumulação de niacina extracelular; baixa produção de catalase à temperatura ambiente e inactivação da enzima a 68°C; reacção fortemente positiva no teste de redução dos nitratos e susceptibilidade à hidrazida de ácido tiofeno-2-carboxílico (THC) (35). Também o teste do ρ -nitro- α -acetilamino- β -hidroxi-propionofenona (NAP), quando associado ao sistema BACTEC 460-TB, permite um diagnóstico laboratorial presuntivo em poucos dias, uma vez que este composto é um inibidor do complexo *M. tuberculosis* (78).

Para além destes métodos existem ainda testes de diagnóstico baseados em factores imunológicos e radiológicos, que por não fazerem parte do âmbito desta Dissertação, não serão aqui abordados.

1.4.2 Métodos moleculares de diagnóstico laboratorial

O desenvolvimento de métodos moleculares de identificação constituiu um avanço importante para o diagnóstico laboratorial de *M. tuberculosis*. Os métodos baseados na utilização de sondas e na amplificação de ácidos nucleicos têm demonstrado possuir um elevado potencial para a detecção rápida de *M. tuberculosis*, quando aplicados em culturas ou directamente na amostra clínica. Entre as várias metodologias disponíveis, destaca-se o sistema AccuProbe® Culture Identification Test (Genprobe, San Diego, Califórnia, EUA), um sistema de identificação de micobactérias a partir da cultura com sondas de DNA (79) e os testes de amplificação de ácidos nucleicos como a reacção em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “Polymerase Chain Reaction”).

Nos últimos anos têm sido comercializados vários sistemas de identificação de micobactérias com base na amplificação de ácidos nucleicos; no entanto, apenas dois estão licenciados pela “Food and Drug Administration” (FDA, EUA), a saber, os testes

“Enhanced *M. tuberculosis* Direct Test” (E-MTD; Genprobe) e o “Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test” (Amplicor, Roche Diagnostic Systems Inc., Branchburg, NJ). Ambos os testes estão validados para aplicação directa em amostras clínicas, no entanto, o teste E-MTD está aprovado para aplicação em amostras respiratórias com baciloscopia positiva e negativa, enquanto que o teste Amplicor apenas está validado para a aplicação em amostras respiratórias com baciloscopia positiva. Actualmente, o “Center for Disease Control” (CDC, EUA) recomenda a realização dos testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos, para a identificação de *M. tuberculosis*, em pelo menos uma amostra respiratória, de doentes com sinais e sintomas de tuberculose pulmonar para os quais existe suspeita de tuberculose mas ainda não existe confirmação do diagnóstico (23).

Estão também disponíveis métodos de identificação de *M. tuberculosis* baseados no princípio da hibridação reversa, que embora não estejam licenciados pela FDA, são um instrumento muito útil para a identificação de micobactérias. Alguns exemplos são o INNOLiPA Rif. TB e o INNOLiPA Mycobacteria V2 (Innogenetics, Ghent, Bélgica), o Genotype MTBDR*plus*, o GenoType MTBC e o GenoType CM/AS (Hain Lifescience GmbH, Hehren, Alemanha). O INNOLiPA Mycobacteria V2 e o GenoType CM/AS permitem a identificação não só do complexo *M. tuberculosis* bem como de um conjunto de outras espécies de micobactérias não tuberculosas (MNT). Os métodos INNOLiPA Rif. TB e o GenoType MTBDR*plus* são utilizados principalmente para a detecção do complexo *M. tuberculosis* e de mutações ligadas à resistência à rifampicina, no primeiro caso, e isoniazida e rifampicina, no segundo, e irão ser abordados no Capítulo Materiais e Métodos.

Ainda que estes métodos de diagnóstico laboratorial permitam a obtenção de resultados num curto espaço de tempo, estes devem ser sempre realizados em paralelo com o exame cultural, uma vez que este é o método de referência para o diagnóstico definitivo de tuberculose, sendo também necessário para a realização do teste de susceptibilidade aos antibacilares. Para além disso, os resultados dos testes moleculares de diagnóstico devem ser sempre interpretados no contexto da história clínica do doente (54).

1.5 Testes de susceptibilidade aos antibacilares

A realização dos testes de susceptibilidade aos antibacilares que irão ser usados no tratamento de infecções causadas por *M. tuberculosis* é indispensável. Tradicionalmente, os métodos utilizados para determinação da susceptibilidade são: (i) o método da razão; (ii) o método das concentrações absolutas; e (iii) o método das proporções (19). Estes métodos utilizam meios de cultura em fase sólida (7H10, 7H11 ou LJ), os quais requerem um período de incubação de 4 a 8 semanas para a detecção de crescimento micobacteriano. Actualmente, e principalmente devido ao tempo necessário para a obtenção de resultados, os testes de eleição para a realização do teste de susceptibilidade recaem em meios de cultura em fase líquida, sendo o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 o mais utilizado. No entanto, o sistema radiométrico BACTEC™ 460-TB ainda é considerado como sistema de referência para a realização de testes de susceptibilidade para *M. tuberculosis*. O método subjacente aos testes de susceptibilidade aos antibacilares utilizado neste trabalho, o método das proporções, irá ser abordado no Capítulo Materiais e Métodos.

1.6 Terapêutica tuberculostática

M. tuberculosis é um alvo terapêutico difícil, devido ao seu longo tempo de geração e reduzida actividade metabólica quando em estado de dormência (186). Para além disso, a localização das lesões (compartimentalização), pode dificultar o acesso dos antibacilares, verificando-se ainda que o baixo pH destes compartimentos (*p.e.* granulomas, *caseum*) pode inibir a acção da maior parte dos antibacilares (68).

Dos antibacilares utilizados para o tratamento da tuberculose, a estreptomicina, a isoniazida, a rifampicina, o etambutol e a pirazinamida são considerados antibacilares de primeira linha, ou essenciais (110), entrando na constituição da esmagadora maioria dos esquemas terapêuticos actualmente utilizados em todo o mundo. Os antibacilares de segunda linha são reservados para as situações em que há suspeita ou confirmação de resistências aos fármacos de primeira linha (111).

O objectivo da terapêutica tuberculostática não passa por apenas tratar a infecção e prevenir recorrências, mas também, esterilizar os focos de infecção e prevenir o aparecimento de resistências. Assim, os antibacilares são seleccionados para eliminar rapidamente os bacilos metabolicamente activos existentes nas cavidades pulmonares; para destruir os bacilos com replicação lenta em lesões caracterizadas por possuírem ambientes acídicos e sem oxigénio; e também para eliminar os bacilos semi-dormentes (*i.e.* com períodos de actividade metabólica intermitente) que de outro modo irão ser os responsáveis pela reemergência da doença (98). Deste modo, os antibacilares utilizados devem possuir, no seu conjunto, três propriedades primordiais: actividade bactericida, actividade esterilizante e capacidade para prevenir o desenvolvimento de resistência (Tabela 1). Neste contexto, é feita a distinção entre agentes que eliminam os bacilos *in vitro* (bactericidas) e aqueles que esterilizam as lesões *in vivo*. Os antibacilares mais eficazes na destruição dos bacilos nestas três categorias são, respectivamente, isoniazida, pirazinamida e rifampicina (98), constituindo estes a base da terapêutica de primeira linha no combate à tuberculose.

Tabela 1. Populações bacilares e fármacos antibacilares (Adaptado de André, 2000 (4)).

Populações bacilares	Meio ambiente e metabolismo	Grau de actividade dos antibacilares	Tipo de actividade
Intracavitária (cavernas)	pH neutro Aeróbio Multiplicação rápida	STR +++ INH +++ RIF ++ EMB +/-?	Bactericida
Intracelular (macrófagos)	pH ácido Anaeróbio Multiplicação lenta	PZA +++ RIF ++ INH + EMB +/-?	Esterilizante
Foco sólido caseoso (<i>caseum</i>)	pH neutro Anaeróbio Multiplicação intermitente	RIF ++	Esterilizante

Legenda: STR: estreptomicina; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; EMB: etambutol e PZA: pirazinamida.

+++ a +/-: níveis de actividade dos antibacilares.

O uso de antibacilares pode levar à selecção de bacilos resistentes, ao exercer a sua acção apenas sobre os bacilos susceptíveis. Deste modo, para prevenir a selecção de mutantes resistentes aos antibacilares, a terapêutica tuberculostática assenta numa terapêutica múltipla. Assim, as três categorias (bactericida, esterilizante e prevenção de aparecimento de resistência) estão presentes em simultâneo.

A terapêutica é dividida em duas fases: uma fase inicial intensiva com a duração de dois meses em que são administrados três antibacilares em conjunto, isoniazida, rifampicina e pirazinamida (111). Juntas, a isoniazida e a rifampicina, eliminam mais de 99% da população bacilar nos primeiros dois meses de terapêutica (46). Em alguns esquemas terapêuticos, é também administrado etambutol ou estreptomicina na fase inicial de tratamento. Segue-se uma fase de continuação, com a duração de quatro meses, apenas com rifampicina e isoniazida (111). Durante esta fase, a rifampicina erradica os bacilos dormentes e a isoniazida elimina os mutantes resistentes à rifampicina quando estes iniciam a replicação.

O aparecimento de estirpes de *M. tuberculosis*, resistentes a um ou mais antibacilares, resultante da selecção de mutantes sob pressão antibacilar, é designado por resistência adquirida. A infecção de novos doentes nunca submetidos a terapêutica tuberculostática, com estirpes previamente resistentes, é designada por resistência primária (113).

Existem três aspectos principais que contribuem para o desenvolvimento da resistência aos antibacilares em *M. tuberculosis*: a ocorrência de mutações espontâneas, um fenómeno natural e de baixa frequência; a selecção de mutantes resistentes por tratamento inadequado e a problemática da transmissão de estirpes resistentes de *M. tuberculosis* (Figura 3).

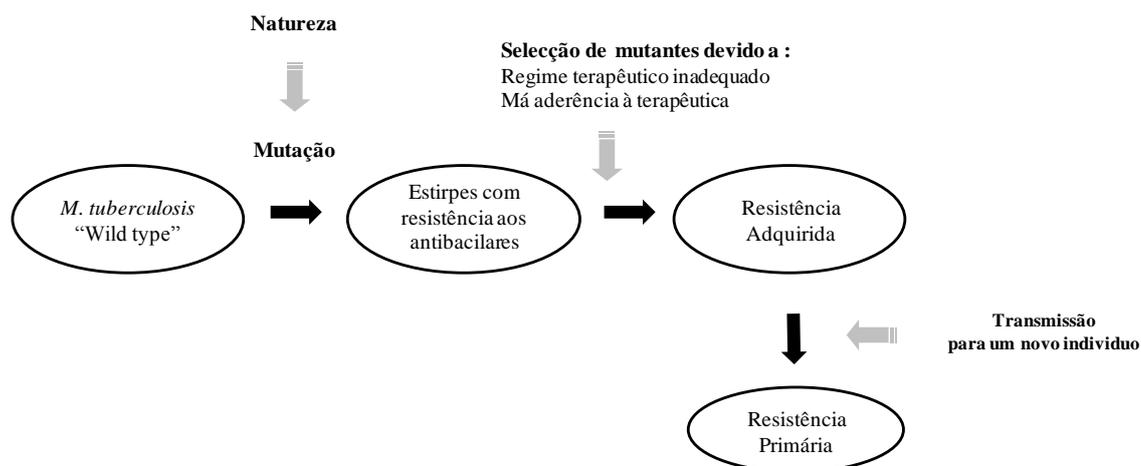


Figura 3. Análise esquemática do desenvolvimento da resistência em *M. tuberculosis* (adaptado de André, 2000 (4)).

Verifica-se, portanto, que a terapêutica tuberculostática é uma “espada de dois gumes”, já que ao mesmo tempo que destrói a fracção populacional bacteriana susceptível, também selecciona os indivíduos resistentes para os quais os antibióticos são ineficazes (72). Deste último efeito resulta o aparecimento de estirpes resistentes e multirresistentes.

1.7 A emergência da multirresistência

M. tuberculosis não possui plasmídeos com genes de resistência aos antibióticos e não é capaz de transferir material genético entre si. A resistência aos antibióticos é assim causada, principalmente, por mutações espontâneas no cromossoma, que podem resultar na selecção de estirpes resistentes durante uma terapêutica inadequada.

A multirresistência é consequência da acumulação de mutações nos genes responsáveis pelo desenvolvimento da resistência individual para cada antibiótico (101). Assim, a probabilidade de aparecimento de resistência a mais do que um antibiótico é o produto da probabilidade de aparecimento de resistência para cada um deles. O risco de aparecimento de mutantes depende não só deste facto mas também da dimensão da população bacteriana presente nos diferentes compartimentos (50). As maiores

populações encontram-se nas lesões cavitárias onde podem atingir 10^8 bacilos viáveis. Nos focos caseosos sólidos a população pode atingir 10^4 a 10^5 microrganismos (4).

Considerando a dimensão populacional e que as células micobacterianas se encontram em diferentes compartimentos ou em diferentes estados fisiológicos, é provável que mesmo que o doente esteja a receber uma terapêutica adequada, existam populações de bacilos que estão efectivamente sob monoterapia ou terapia dupla (50). Isto implica que numa população de *M. tuberculosis* existam subpopulações de micobactérias resistentes (heteroresistência) que serão seleccionadas durante o tratamento (74,94). A existência de organismos previamente resistentes pode acelerar a emergência da resistência e foi reconhecido inicialmente para a estreptomicina (50) e mais recentemente para a isoniazida, etambutol (134) e rifampicina (76).

Uma forma particularmente preocupante é a emergência de estirpes de *M. tuberculosis* multirresistentes (MDRTB). A multirresistência é definida pela resistência simultânea pelo menos à isoniazida e rifampicina, os dois antibacilares mais potentes utilizados na terapêutica da tuberculose. O tratamento de casos multirresistentes envolve o uso de antibacilares de segunda linha que apresentam maior toxicidade, são menos eficazes e mais dispendiosos do que os utilizados na terapêutica de primeira linha. Para agravar esta situação, foram descritas recentemente estirpes de *M. tuberculosis* extensivamente resistentes (XDRTB), termo que designa estirpes resistentes à isoniazida, rifampicina, a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um dos antibióticos injectáveis de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina) (65). A infecção causada por estas estirpes é virtualmente intratável (22).

1.7.1 Base genética da resistência aos antibacilares em *M. tuberculosis*

A resistência aos antibióticos pode ser uma característica intrínseca (inata) do microrganismo ou pode resultar da ocorrência de mutações espontâneas ou aquisição de material exógeno (107). Em *M. tuberculosis*, não ocorre transferência de material exógeno, sendo a aquisição de mutações cromossomais ou os mecanismos de efluxo, os

principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência. Com a caracterização do genoma de *M. tuberculosis* em 1998 (28), muitas portas se abriram de modo a compreender melhor qual a base genética da resistência aos antibióticos em *M. tuberculosis*.

A existência de isolados clínicos de *M. tuberculosis* que apresentam resistência a um ou mais antibióticos, devida a mutações nos genes-alvo está bem documentada, tanto para os antibióticos de primeira linha como para os de segunda linha. Neste subtópico, iremos abordar apenas os antibióticos de primeira linha, incidindo principalmente nos mecanismos que conferem resistência à isoniazida e rifampicina, uma vez que serão os analisados nesta Dissertação.

1.7.1.1 Mecanismos de resistência à estreptomicina

Descoberta por Waksman em 1944, a estreptomicina foi o primeiro antibiótico a demonstrar actividade contra *M. tuberculosis* (140). A estreptomicina é um antibiótico aminociclitol glicósido que interfere com a síntese proteica em procariotas ao ligar-se ao ribossoma.

O ribossoma é constituído por duas subunidades, a subunidade 30S e a 50S. A subunidade 30S, por sua vez é constituída pelo rRNA 16S (codificado pelo gene *rrs*) e um conjunto de proteínas: S1 a S21. A estreptomicina liga-se à subunidade 30S ribossomal, inibindo o início da tradução e afectando a fidelidade da tradução (126).

A maioria das mutações que conferem resistência à estreptomicina em *M. tuberculosis*, ocorrem na proteína ribossomal S12, codificada pelo gene *rpsL* (126). Neste gene, as mutações mais comuns encontram-se no codão 43 (AAG→ACG) e na posição 88 (AAG→AGG) (48,126).

Um segundo tipo de mutações associadas à resistência à estreptomicina ocorre no gene *rrs*, nomeadamente nas regiões nucleotídicas 530 (a mais comum) e na região 915 (126). Normalmente, as bactérias possuem múltiplas cópias do gene *rrs*, o que não é o

caso de *M. tuberculosis*, em que apenas existe uma cópia deste gene. Mutações nestes genes têm sido descritas em aproximadamente 65-67% dos isolados clínicos resistentes (126).

A resistência à estreptomicina pode ser classificada em três tipos: resistência de alto nível, resistência intermédia e resistência de baixo nível. A resistência de alto nível é encontrada apenas em isolados que apresentam mutações no gene *rpsL*; a resistência intermédia está maioritariamente associada com mutações no gene *rrs*; e a resistência de baixo nível encontra-se em isolados que não apresentam mutações no gene *rpsL* ou no gene *rrs* (96). Os isolados com resistência de baixo nível correspondem aproximadamente a um terço dos isolados clínicos com resistência à estreptomicina (48,95,160). Estes dados sugerem a possibilidade de ocorrência de outros mecanismos de resistência a este fármaco.

O gene *gidB*, que codifica para uma metiltransferase 7-metilguanosina conservada e específica para o rRNA 16S, foi identificado recentemente como estando potencialmente envolvido na resistência de baixo nível à estreptomicina (108). Por outro lado, tem sido sugerido que os baixos níveis de resistência à estreptomicina possam estar associados à reduzida permeabilidade da membrana celular (48). Um estudo recente sugere ainda a existência de resistência à estreptomicina por mecanismos de efluxo em *M. tuberculosis*, permanecendo no entanto ainda por esclarecer quais os tipos de bombas de efluxo e o nível de regulação de expressão dos genes envolvidos (158).

1.7.1.2 Mecanismos de resistência ao etambutol

O etambutol ([S,S']-2,2-[ethylenediimino]di-1-butanol), tem como alvo a parede celular micobacteriana, actuando através da interacção com arabinosil transferases envolvidas na biosíntese de arabinogalactano e lipoarabinomanano (9). Segundo Telenti *et al.*, o desenvolvimento da resistência ao etambutol ocorre de modo gradual, envolvendo vários alvos (170). Em *M. tuberculosis* foram identificados três genes

homólogos (partilhando 65% de homologia entre si) que codificam para as arabinosil transferases; os genes *embC*, *embA* e *embB*, que estão organizados num operão, designado por *embCAB* (170). O principal mecanismo de resistência ao etambutol em *M. tuberculosis* resulta de mutações pontuais neste operão, em particular, na posição 306 do gene *embB* (*embB306*) na grande maioria dos isolados resistentes (56,118,127,164,170). Para além da ocorrência de alterações em *embB306*, várias outras têm sido descritas na região determinante de resistência ao etambutol (ERDR, do inglês “Ethambutol Resistance Determining Region”), compreendida entre os aminoácidos 238 a 436 do gene *embB* (uma região altamente conservada em *M. tuberculosis*), bem como em *embA* e *embC* (127,164,170).

Embora a ocorrência de alterações em *embB306* tenha sido sugerida como potencial marcador para a resistência ao etambutol (127,165), este não é um assunto consensual. Estudos recentes descreveram a ocorrência de mutações no *embB306* em isolados de *M. tuberculosis* fenotipicamente susceptíveis ao etambutol. Estes estudos referem que as mutações neste codão são apenas um polimorfismo comum existente em estirpes clínicas de *M. tuberculosis* com predisposição para o desenvolvimento de resistência a outros antibacilares (56,118,164,199). Isto sugere a existência de um outro alvo ou a existência de outros mecanismos, tais como a influência da permeabilidade celular e de sistemas de efluxo na resistência ao etambutol.

A resistência ao etambutol é frequente entre isolados de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais antibacilares (56,118), sendo a monorresistência rara.

1.7.1.3 Mecanismos de resistência à pirazinamida

A pirazinamida é um análogo estrutural da nicotinamida, tendo a sua actividade farmacológica contra *M. tuberculosis* sido identificada em 1952 (72). A sua actividade é específica apenas para os elementos do complexo *M. tuberculosis* (excepto *M. bovis*), não possuindo qualquer efeito sobre outras espécies de micobactérias (198). Embora seja responsável pela eliminação de bacilos durante a fase intensiva de tratamento,

possui fraca actividade contra bacilos metabolicamente activos. A sua actividade é aumentada em bacilos semi-dormentes ou em fase estacionária (197).

A pirazinamida é um pro-fármaco que necessita de ser convertido na sua forma activa, o ácido pirazinóico (POA, do inglês “Pyrazinoic Acid”) (156), pela enzima pirazinamidase (PZase), codificada pelo gene *pncA* (142). O POA acumula-se no citoplasma, devido a uma bomba de efluxo deficiente (195,197). A acumulação de POA resulta numa redução do pH intracelular (195) a um nível que, provavelmente, irá inactivar uma enzima envolvida na síntese de ácidos gordos, a sintetase de ácidos gordos I (FASI, do inglês “Fatty Acid Synthase type I”) (200). A pirazinamida apenas é activa contra *M. tuberculosis* em pH ácido (156).

Foi demonstrado por Scorpio *et al.* que as mutações no gene *pncA* constituem o principal mecanismo de resistência à pirazinamida em *M. tuberculosis* (142). Estes dados foram já comprovados em vários estudos, tendo sido identificada, em mais de 70% dos isolados resistentes, uma vasta gama de substituições nucleotídicas que cobrem todo o gene *pncA* ou a sua região promotora (72,73,124,142,152,162). No entanto, algumas destas mutações foram também identificadas em estirpes susceptíveis à pirazinamida (73).

Estes estudos revelaram também a existência de isolados de *M. tuberculosis* com resistência à pirazinamida que não apresentam mutações no gene *pncA*, sugerindo a existência de outros mecanismos envolvidos. Estes podem envolver a regulação do gene *pncA*; o “uptake” da pirazinamida; o efluxo de ácido pirazinóico (130) ou a heterorresistência (198).

1.7.1.4 Mecanismos de resistência à isoniazida

A isoniazida, ou hidrazida de ácido nicotínico, é um agente bactericida utilizado na terapêutica da tuberculose desde 1952. A sua entrada na célula ocorre por difusão passiva através do envelope celular micobacteriano (180). É um dos antibacilares mais

eficientes utilizado no tratamento da tuberculose. A sua actividade é específica apenas contra os elementos do género *Mycobacterium*, principalmente contra bacilos de crescimento lento (complexo *M. tuberculosis*), exercendo reduzida actividade contra outras espécies de micobactérias (180).

A isoniazida é um pro-fármaco que necessita de ser convertido na sua forma activa, um intermediário reactivo com acção antimicrobiana, pelo produto do gene *katG* (62,180,192). A enzima KatG é uma catalase-peroxidase multifuncional que possui, para além desta, outras actividades incluindo actividade de peroxinitritase (188) e NADH oxidase (151). O gene *katG* é importante para a virulência de *M. tuberculosis in vivo*, uma vez que está envolvido no controlo do “stress” oxidativo (103).

A sua actividade é bacteriostática nas primeiras 24 horas de tratamento, período após o qual é bactericida (180). Durante o mesmo período de tempo a célula perde a capacidade de álcool-ácido-resistência, apresentando alterações morfológicas tais como a perda da sua estrutura interna ou outras deformações (167).

A isoniazida, ao ser activada pela enzima KatG, vai formar um hipotético radical isonicotinoil que se liga à nicotinamida adenina dinucleótido (NAD, do inglês “Nicotinamide Adenine Dinucleotide”), formando um complexo ternário. A ligação isoniazida-NAD (INH-NAD) resultante vai inibir a InhA (137). A proteína InhA (produto do gene *inhA*) é o alvo fisiológico relevante da isoniazida (7). O gene *inhA* codifica para a proteína transportadora enoil-acil (ACP) reductase dependente da nicotinamida adenina dinucleótido hidrogenase (NADH, do inglês “Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogenase”) (41) do sistema FASII (FASII, do inglês “Fatty Acid Synthase type II”) (90). Mutações no gene *katG* levam à inibição da InhA com consequente acumulação de cadeias longas de ácidos gordos (36), inibição da biosíntese de ácidos micólicos (180) e por fim, morte celular (167) (Figura 4).

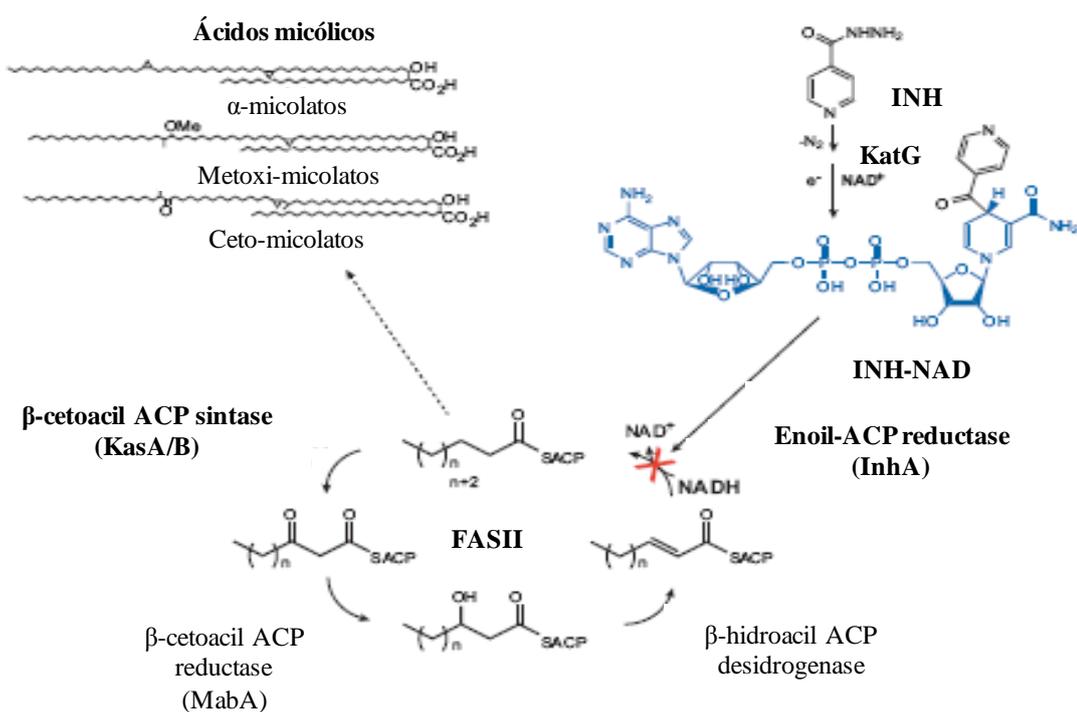


Figura 4. Mecanismo proposto para o modo de acção da isoniazida (adaptado de Vilchèze and Jacobs, 2007 (180)). INH: isoniazida.

A resistência à isoniazida parece estar associada a uma multiplicidade de mutações que afectam um ou mais genes, nomeadamente, os genes *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, *ndh* e a região intragénica *oxyR-aphC*.

1.7.1.4.1 O gene *katG*

A maioria das mutações responsáveis pela resistência à isoniazida em isolados clínicos de *M. tuberculosis* ocorre no gene *katG*. Considerando o genoma de *M. tuberculosis*, a região onde se encontra o gene *katG* é altamente variável e, devido à presença de sequências repetidas, torna-se instável. Este facto pode contribuir para o aumento da probabilidade de ocorrência de mutações neste gene (194).

As mutações no gene *katG* ocorrem nas regiões N-terminal e C-terminal da proteína KatG. A região N-terminal está associada ao local activo da enzima catalase-peroxidase (63) e a maioria das mutações que conferem elevados níveis de resistência estão

localizadas entre os codões 138 e 350. A mutação mais comum é uma mutação pontual no codão 315, que resulta numa substituição de uma serina (S) por uma treonina (T) (S315T). Estima-se que a mutação S315T ocorra em cerca de 50 a 90% dos isolados resistentes à isoniazida (6,29,52,57,176,178). O polimorfismo mais frequente associado à mutação S315T ocorre no codão 463, onde o resíduo de arginina (R) é substituído por uma leucina (L) (6,52,63,72). Esta substituição encontra-se no terminal C da proteína não afectando a actividade da proteína, nem conferindo resistência à isoniazida (63).

As mutações no gene *katG* podem resultar na redução ou perda total da actividade de catalase-peroxidase (61,192). Estas incluem mutações “missense” e “nonsense”, inserções, deleções, regiões truncadas e, mais raramente, a deleção total do gene (126,192).

A resistência à isoniazida está relacionada com a perda de actividade de catalase-peroxidase (192). Zhang *et al.* mostraram que, quando uma cópia funcional do gene *katG* é introduzida em estirpes de *Mycobacterium smegmatis* e *M. tuberculosis*, deficientes nesta enzima, estas estirpes recuperam a susceptibilidade à isoniazida (193).

1.7.1.4.2 O gene *inhA*

Como referido anteriormente, a proteína InhA (produto do gene *inhA*) é o alvo fisiológico relevante da isoniazida. O gene *inhA* está organizado num operão juntamente com o gene *mabA* (128). As mutações que ocorrem no gene *inhA* resultam em substituições nucleotídicas que promovem um decréscimo da afinidade da isoniazida para o NAD (7). Na região estrutural do gene *inhA* estão descritas, pelo menos, oito mutações associadas com a resistência à isoniazida (I16T, I21T, I21V, I47T, V78A, I95P, I194T e S94A) (41,72,126). A mutação S94A (a mais frequente nesta região) parece afectar a ligação INH-NAD, e está restrita a estirpes de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida (57,72). Estes resultados são consistentes com as interacções estruturais entre a isoniazida e a InhA e suportam a importância das mutações no gene *inhA* na resistência clínica à isoniazida (57).

No entanto, as mutações na região promotora do gene *inhA* ocorrem com maior frequência, com uma maior incidência para a mutação C-15T (1,52,57,128).

As mutações no gene *inhA* conferem níveis baixos ou intermédios de resistência (72) e as mutações na região estrutural do gene geralmente co-existem com mutações na sua região promotora e/ou com mutações no gene *katG* (52,57,128).

1.7.1.4.3 O gene *kasA*

O gene *kasA*, que codifica a β -cetoacil-ACP sintetase (KasA), é outro alvo da isoniazida, após sua activação inicial pelo gene *katG* (93,128,154). Esta enzima está também envolvida na síntese de ácidos micólicos (93) e mutações neste gene têm sido relacionados com baixos níveis de resistência à isoniazida (93,128). As mutações encontram-se quer em isolados resistentes quer em isolados susceptíveis e geralmente co-existem com mutações nos genes *katG* ou *inhA* (57,120,166).

1.7.1.4.4 O gene *ahpC* e região intragénica *oxyR-aphC*

Mutações no gene *ahpC*, que codifica para a enzima alquil hidroperoxidase reductase, e na sua região promotora têm sido encontradas em cerca de 10% a 13% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida (57,163) e, normalmente estão associadas a mutações no gene *katG* ou *inhA* (156,163). No entanto, mutações neste gene também têm sido observadas em isolados susceptíveis, indicando que estas mutações não estão implicadas no desenvolvimento de resistência à isoniazida (6,57).

1.7.1.4.5 O gene *ndh*

Mutações no gene *ndh*, que codifica para a NADH desidrogenase, têm sido encontradas, num pequeno número de isolados clínicos, tanto susceptíveis como resistentes à

isoniazida (20,57,80). A mutação mais frequente é a V18A, que é observada independentemente do perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos testados (57). Apenas a mutação R268H é encontrada exclusivamente em estirpes clínicas de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida (57,80). Estes resultados sugerem que a mutação R268H do gene *ndh* desempenha um papel na resistência à isoniazida (57).

Em resumo, a grande maioria dos isolados clínicos resistentes à isoniazida, apresenta mutações no gene *katG*, com maior prevalência para a mutação S315T, sendo estas as responsáveis pela resistência de alto nível encontrada entre os isolados. As mutações no gene *inhA* representam o segundo mecanismo de resistência mais comum. Neste gene, as mutações S94A na região estrutural e a mutação C-15T na sua região promotora, são as que ocorrem com maior frequência. Juntas, as mutações no gene *katG* e *inhA*, são responsáveis por mais de 75% dos casos de resistência à isoniazida em isolados clínicos de *M. tuberculosis* (52). Por outro lado, permanece difícil determinar qual o papel das mutações que ocorrem nos genes *kasA*, *ahpC* e região intragénica *oxyR-aphC* e no gene *ndh*, no estabelecimento da resistência clínica à isoniazida em isolados de *M. tuberculosis*.

A ocorrência de isolados clínicos sem qualquer mutação identificada nos genes enumerados acima, tem sido também descrita (20,52,120). Este facto sugere o envolvimento de outros alvos/genes ou de outros mecanismos tais como efluxo na resistência à isoniazida em *M. tuberculosis* (ver ponto 1.7.3).

1.7.1.5 Mecanismos de resistência à rifampicina

Em uso desde 1972, a rifampicina é um componente indispensável na terapêutica da tuberculose (72,126).

A rifampicina impede a síntese de RNA, através sua ligação à subunidade β da RNA polimerase (153). As células bacterianas que apresentam resistência à rifampicina possuem a RNA polimerase alterada (81). O local de ligação da rifampicina é uma

concauidade localizada no canal principal de entrada da cadeia dupla de DNA, a montante do centro catalítico da polimerase (196). Todas as substituições aminoacídicas que conferem resistência à rifampicina estão localizadas à volta desta concauidade (196).

As mutações que conferem resistência à rifampicina estão associadas a um “hotspot” (codão 511 a 533), designado por região determinante de resistência à rifampicina (RRDR, do inglês “Rifampicin Resistance Determining Region”) composto por 81 pares de bases, no gene que codifica para a subunidade β da RNA polimerase, o gene *rpoB* (Figura 5) (135,169). Estas mutações incluem mutações pontuais, pequenas deleções e inserções.

Aproximadamente 95% dos casos de estirpes de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina, possuem mutação nesta zona específica do gene, estando descritas actualmente mais de 30 mutações (58,59,72,75,133,135,146,169,183).

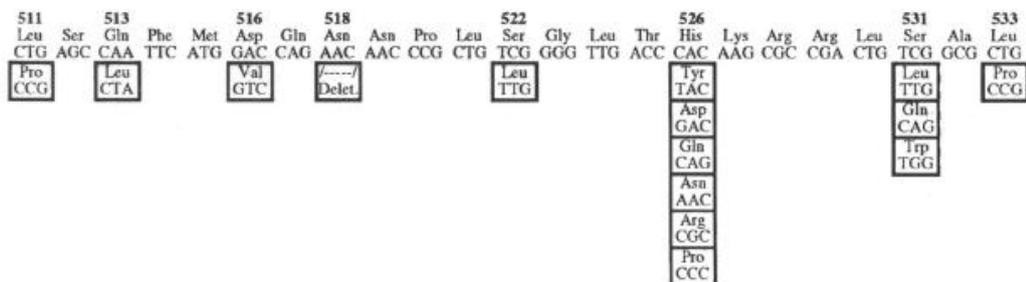


Figura 5. Representação esquemática de algumas das mutações associadas à resistência à rifampicina em *M. tuberculosis* na RRDR. Os codões estão numerados de acordo com a numeração do gene *rpoB* de *Escherichia coli* (adaptado de Telenti *et al.*, 1993 (169)).

A maioria das estirpes resistentes à rifampicina apresenta uma mutação no gene *rpoB*. Por outro lado, também já foi descrita a ocorrência de duas a quatro mutações em simultâneo, embora estas ocorram raramente (58,135).

As mutações mais prevalentes afectam os codões 531 e 526 (59,126,183) e resultam num elevado nível de resistência à rifampicina (concentração mínima inibitória (CMI) de 32 a 256 µg/ml). No entanto, nem todas as mutações resultam no mesmo nível de resistência, *p.e.*, as mutações que ocorrem nos codões 511, 516, 518 e 522 resultam num reduzido nível de resistência (66).

Finalmente, cerca de 5% das estirpes resistentes não apresentam mutação na RRDR (72). Mutações encontradas fora da RRDR podem ou não estar associadas à resistência à rifampicina (58,133). Por exemplo, a mutação V146F (58,133) confere baixo nível de resistência (133). A maioria das estirpes susceptíveis à rifampicina não apresenta mutações no gene *rpoB*, no entanto, estão descritas algumas excepções (191).

Enquanto a monorresistência à isoniazida é comum, a monorresistência à rifampicina é rara (21,156,183). Para além disso, a resistência à rifampicina ocorre na maioria das vezes associada à resistência à isoniazida. Assim, a resistência à rifampicina pode ser utilizada como marcador preditivo para a multirresistência em *M. tuberculosis* (54,157).

1.7.2 Taxas de mutação e custo biológico associado à aquisição de mutações

A probabilidade de uma mutação originar um fenótipo de resistência aos antibióticos vai influenciar a taxa de mutação da estirpe em causa. A taxa de mutação é uma estimativa da probabilidade de ocorrência de uma mutação por geração e corresponde à probabilidade de ocorrência de mutação durante o tempo de vida de uma célula bacteriana. A frequência de mutação é simplesmente a proporção de mutantes presentes numa cultura (34). A taxa de mutação depende da estrutura e número de genes nos quais as mutações poderão originar um fenótipo selectivo. Para além destes, existem outros factores que podem influenciar o aumento das taxas de mutação, tais como, agentes mutagénicos e a eficácia do sistema de reparação de DNA (91). O método mais utilizado para a determinação de taxas de mutação é o teste de flutuação desenvolvido por Luria e Delbruck (87). Este tem sido o método de eleição para determinação de

taxas de mutação em *M. tuberculosis* (34,189) e foi também o utilizado nesta Dissertação, pelo que será descrito em pormenor no Capítulo Materiais e Métodos.

Estirpes de *M. tuberculosis* que apresentam uma susceptibilidade reduzida aos antibacilares podem possuir uma vantagem ambiental selectiva se o desempenho fisiológico da bactéria for preservado após a aquisição da mutação (49). Doentes infectados com estirpes resistentes possuem uma reduzida probabilidade de cura e podem, se estiverem sob níveis terapêuticos sub-óptimos, permanecer infecciosos durante mais tempo. Este facto pode providenciar um risco permanente de transmissão de estirpes multirresistentes. Por exemplo, a linhagem Beijing tem sido relacionada com o desenvolvimento da multirresistência em *M. tuberculosis*, associada a uma elevada capacidade de disseminação e aptidão para causar doença (51,55,69). Em Portugal, mais especificamente na Região da Grande Lisboa, verifica-se a predominância de um genótipo, identificado inicialmente como “Cluster A” (123) e actualmente designado por Família Lisboa, associado ao desenvolvimento de multirresistência e a uma maior capacidade de disseminação (117).

O desempenho de um microrganismo, ou “fitness”, corresponde à sua capacidade de sobrevivência, reprodução e transmissão no hospedeiro (26). É esperado que estirpes que apresentem uma mutação que lhes confira resistência não sejam capazes de se disseminar com a mesma facilidade de uma estirpe susceptível. Vários estudos mostram que as mutações responsáveis pela aquisição de resistência impõem um custo biológico (12), no entanto, nem todas as mutações possuem o mesmo efeito no “fitness” da bactéria.

O “fitness” em estirpes resistentes de *M. tuberculosis* depende não só da mutação que lhe confere resistência mas também do “background” genético da estirpe em causa (49). Por exemplo, algumas mutações que conferem resistência a rifampicina (como por exemplo a mutação S531L no gene *rpoB*) estão associadas a diminuições mínimas no “fitness” da estirpe em causa, enquanto que com outras (por exemplo, R529Q) ocorre um “deficit” em cerca de 50% (12,49). Mutações que não impõem um custo biológico são mais prevalentes entre os isolados clínicos resistentes e estes mutantes irão, com o

passar do tempo, reter esta característica ou compensar o “fitness” através da acumulação de mutações compensatórias.

A ocorrência de mutações compensatórias em *M. tuberculosis* tem sido associada, principalmente, à aquisição de resistência à isoniazida, evidenciando assim, que a aquisição de mutações compensatórias pode restaurar o potencial reprodutivo em estirpes monorresistentes (143). Foi também sugerido que ocorrência de mutações múltiplas no gene *rpoB* se possa dever a um mecanismo compensatório, que atenua o custo associado à mutação original, através da aquisição de mutações de segunda ordem (131). Como referido anteriormente, foi já descrita a ocorrência de duas a quatro mutações em simultâneo no gene *rpoB* em isolados clínicos de *M. tuberculosis*. A selecção gradual de estirpes de *E. coli* com mutações múltiplas no gene *rpoB*, revelou que o duplo mutante L511Q + D516G exhibe um “fitness” relativo maior ou igual ao da estirpe que lhe deu origem, estando esta dupla mutação já descrita em *M. tuberculosis* (131). Reynolds sugere que o aparecimento desta dupla mutação é favorecido não meramente como a combinação de duas mutações de baixo nível de resistência mas também porque as duas juntas predis põem à resistência e preservam o “fitness” da estirpe em causa.

1.7.3 Resistência intrínseca: o contributo das bombas de efluxo na resistência em *M. tuberculosis*

A resistência intrínseca aos antibióticos foi considerada durante muito tempo um mecanismo passivo, baseado na ausência de um alvo para o antibiótico em questão ou no facto de a bactéria ser refractária à entrada deste na célula, devido à reduzida permeabilidade da parede celular (40). Hoje em dia, tornou-se evidente que a resistência intrínseca depende também da expressão, seja constitutiva ou induzida, de sistemas de efluxo (106,121,139). Neste caso, os antibióticos actuam como indutores, regulando a expressão de bombas de efluxo, quer ao nível da transcrição, quer ao nível da tradução (185). Os mecanismos de efluxo são reconhecidos como tendo uma função relevante na

aquisição de resistência (82,105), principalmente em bactérias que desenvolveram multirresistência fenotípica (82).

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras que estão envolvidas na extrusão de substâncias nocivas para a célula, encontrando-se tanto em células eucariotas como procariotas (187). Os sistemas de efluxo bacterianos descritos até ao momento agrupam-se em cinco superfamílias ou famílias, de acordo com a sua estrutura e fontes de energia; I. superfamília “Adenosine Triphosphate (ATP) -Binding Cassete” (ABC); II. família “Small Multidrug Resistance” (SMR); III. família “Multidrug And Toxic compound Extrusion” (MATE); IV. família “Resistance-Nodulation Division” (RND); e V. superfamília “Major Facilitator” (MFS) (121).

Estes transportadores podem ser classificados como transportadores activos primários (superfamília ABC), se recorrerem à fonte de energia primária, o ATP; ou transportadores activos secundários, se actuarem com base no gradiente do potencial electroquímico na membrana plasmática, a força protomotriz (MFS, SMR, RND, e MATE) (40). Alguns transportadores da família MATE podem também utilizar o gradiente de Na^+ como fonte de energia (121). Algumas bombas de efluxo possuem substratos específicos, no entanto, muitas fazem a extrusão de diversos substratos e vários outros compostos, química e estruturalmente não relacionados, de modo dependente de uma fonte de energia (187).

Geralmente, os sistemas de efluxo são responsáveis pela resistência de baixo nível aos antibióticos, contrastando com a resistência de alto nível causada por mutações nos genes que codificam os alvos primários desses antibióticos (39). No entanto, a sobre-actividade dos sistemas de efluxo pode resultar numa diminuição dos níveis intracelulares dos antibióticos, permitindo deste modo a sobrevivência de uma subpopulação bacteriana, até que sejam seleccionados mutantes com alterações nos genes responsáveis pela resistência e o seu estabelecimento na população, determinando assim, níveis de resistência clinicamente significativos (91,187). Assim, apesar da resistência de alto nível não se dever à sobre-actividade dos sistemas de efluxo, ela pode resultar da acção conjunta destes sistemas e da mutação.

Em micobactérias, a resistência intrínseca à maioria dos antibióticos, é geralmente atribuída à reduzida permeabilidade da parede celular, nomeadamente à sua complexa estrutura e constituição, que pode limitar a entrada dos antibióticos na célula (16). Juntamente com a reduzida permeabilidade, os sistemas de efluxo também promovem o desenvolvimento de resistência, através da extrusão de moléculas que entram na célula (40,106,182), sendo que a concentração intracelular de um determinado antibiótico corresponde ao balanço entre o influxo e efluxo deste (40).

Um das estratégias utilizadas para o estudo de sistemas de efluxo em *M. tuberculosis* assenta na caracterização individual de proteínas transportadoras, através de técnicas de clonagem e expressão dos genes em micobactérias de crescimento rápido (*p.e. M. smegmatis*). Neste contexto, foram já caracterizadas várias bombas de efluxo de *M. tuberculosis* (Tabela 2 e Referências 25 e 33), muitas das quais se demonstrou estarem envolvidas no transporte de diferentes antibióticos, incluindo fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina, isoniazida e etambutol. Permanece no entanto, por demonstrar o papel por elas desempenhado na resistência aos antibióticos (121).

Tabela 2. Genes que codificam para possíveis bombas de efluxo associados a resistência à isoniazida e rifampicina em *M. tuberculosis*.

Gene ⁽¹⁾	Proteína/Função	Possível(is) substrato(s)	Família	Referência
<i>Rv1819c</i>	Proteína transmembranar de ligação ao ATP/ Transporte de antibióticos	INH	ABC	28,71
<i>pstB</i> (<i>Rv0933</i>)	Proteína de ligação ao ATP/ Transporte de fosfatos e extrusão de antibióticos	INH, RIF, EMB, CIP	ABC	15,28,141
<i>Rv1747</i>	Proteína transmembranar conservada de ligação ao ATP	INH	ABC	15,28
<i>efpA</i> (<i>Rv2846c</i>)	Proteína integral de membrana (proteína de efluxo) / Extrusão de antibióticos	INH, fluoroquinolonas, BE, corantes catiónicos, acriflavina	MFS	28,45,84
<i>P55</i> (<i>Rv1410c</i>)	Proteína integral de membrana/ Extrusão de antibióticos	INH, RIF, TET, aminoglicosídeos	MFS	28,71,150
<i>tap</i> (<i>Rv1258c</i>)	Proteína de membrana conservada/ Extrusão de antibióticos	INH, RIF, EMB, OFL, TET, macrólidos	MFS	2,28,39;71,147

ABC: superfamília “Adenosine Triphosphate (ATP) -Binding Cassete”; BE: brometo de etídeo; CIP: ciprofloxacina; EMB: etambutol; INH: isoniazida; MFS: superfamília “Major Facilitator”; OFL: ofloxacina; RIF: rifampicina; TET: tetraciclina. (1) Em relação ao genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (28).

Tabela 2. (Cont.)

Gene⁽¹⁾	Proteína/Função	Possível(is) substrato(s)	Família	Referência
<i>mmpL7</i> (<i>Rv2942</i>)	Proteína transportadora transmembranar / Extrusão de antibióticos	INH	RND	28,44,116,119
<i>mmr⁽²⁾</i> (<i>Rv3065</i>)	Proteína de membrana integral (proteína de efluxo) / Extrusão de antibióticos	BE, corantes, ERY, fluoroquinolonas	SMR	28,38
<i>whiB7</i>	Regulação da transcrição / proteína reguladora transcricional e gene efetor	RIF	Proteína reguladora	28,147
<i>inhA</i> (<i>Rv0342</i>)	Proteína de membrana InhA induzida pela INH / Transporte de antibióticos	INH, EMB	Proteína de membrana	3,27,28
<i>inhB</i> (<i>Rv0341</i>)	Proteína de membrana InhB induzida pela INH / Transporte de antibióticos	INH	Proteína de membrana	3,27,28
<i>inhC</i> (<i>Rv0343</i>)	Proteína de membrana InhC / Envolvida na transcrição	INH	Proteína de membrana	3,27,28

BE: brometo de etídeo; ERY: eritromicina; EMB: etambutol; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; RND: família “Resistance-Nodulation Division”; SMR: família “Small Multidrug Resistance”. (1) Em relação ao genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (28). (2) Não se encontrava associada a resistência à INH ou RIF à data de início deste trabalho.

Uma outra forma de caracterização de sistemas de efluxo activos, baseia-se numa abordagem indirecta, tendo como pressuposto que estes sistemas de efluxo podem ser inibidos por compostos denominados inibidores de bombas de efluxo (EPIs, do inglês “Efflux Pump Inhibitors”) (89). Se de facto um determinado composto tiver capacidade de inibir um sistema de efluxo envolvido na resistência a um determinado antibiótico, espera-se que na presença desse inibidor, o microrganismo em estudo se torne mais susceptível ao mesmo. Assim, comparação entre a concentração mínima inibitória para um antibiótico na presença e na ausência de um EPI permite avaliar a presença e a contribuição do(s) sistema(s) de efluxo sensíveis ao EPI na resistência a esse antibiótico.

Como exemplos de compostos inibidores de bombas de efluxo já utilizados para este fim, podemos citar as fenotiazinas, como a tioridazina (TZ) e a clorpromazina (CPZ), o verapamil (VP) ou a reserpina (RES) (92,147,181,182). Estes são compostos usados no tratamento de patologias não infecciosas e possuem actividade antibacteriana. As fenotiazinas são antagonistas dos receptores de dopamina e inibem o transporte de cálcio (Ca^{2+}) impedindo a sua ligação à calmodulina e são utilizados como neurolépticos e antipsicóticos (92). Um outro composto antagonista dos canais de cálcio é o verapamil, composto este que é considerado um inibidor de várias bombas de efluxo (182). Na clínica, o verapamil é utilizado no tratamento da hipertensão, angina de peito, arritmia cardíaca, enxaquecas e também como vasodilatador. A reserpina, um alcalóide indole, possui propriedades antipsicóticas e antihipertensivas, no entanto, devido aos seus efeitos secundários graves a sua aplicabilidade na prática clínica é limitada (89).

1.8 Objectivos desta Dissertação

De modo a melhor compreender quais os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da multirresistência em *M. tuberculosis*, neste trabalho propôs-se a realização de um processo de exposição de *M. tuberculosis* aos dois principais antibacilares de primeira linha, isoniazida e rifampicina, exposição essa realizada independentemente. Deste modo, espera-se poder estabelecer uma relação entre a resistência à rifampicina e a

resistência à isoniazida. Esta adaptação deverá mimetizar a resposta ao “stress” antibiótico por parte dos bacilos que infectam um doente sujeito a terapia sub-ótima, dando origem ao desenvolvimento da tuberculose multirresistente. Em trabalhos anteriores demonstrou-se que a exposição de estirpes de *M. tuberculosis* susceptíveis a determinado antibiótico induz a actividade de bombas de efluxo que vão tornando a bactéria mais resistente a esse mesmo antibiótico (181,182). Assim, nesta Dissertação pretende-se (i) estudar e relacionar os dois principais mecanismos que levam à emergência de resistência durante o tratamento contra *M. tuberculosis*; a aquisição de mutações e a sobreexpressão de bombas de efluxo; (ii) compreender se a exposição prolongada de estirpes monorresistentes à rifampicina à concentração crítica da mesma pode levar à ocorrência de alterações genéticas que promovam a estabilização de génotipos de resistência à isoniazida; e (iii) descrever a forma como a multirresistência genética se poderá instalar nas populações bacterianas de um doente com tuberculose activa e a sua ligação com a actividade diferencial das principais bombas de efluxo de *M. tuberculosis* em bacilos sujeitos à pressão antibiótica.

Procura-se assim contribuir para o esclarecimento dos mecanismos genético-fisiológicos subjacentes à emergência da multirresistência em *M. tuberculosis*, procurando ao mesmo tempo identificar compostos ou procedimentos que possam prevenir esta emergência, constituindo uma estratégia terapêutica alternativa que, no futuro, poderá ajudar a controlar a disseminação da tuberculose multi- e extensivamente resistente

2. Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Material biológico

Para a execução deste estudo foram seleccionadas duas estirpes de *M. tuberculosis*, a estirpe de referência H37Rv (ATCC27294^T), susceptível aos cinco antibacilares de primeira linha, e um isolado clínico, 359/03, monorresistente à rifampicina, recolhido em 2003 num hospital de Lisboa. Estas estirpes pertencem à colecção de culturas do Laboratório de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT/UNL).

A estirpe H37Rv representa uma das estirpes mais utilizadas para os estudos desta espécie, motivo pelo qual foi seleccionada para este trabalho. Esta estirpe foi isolada há cerca de 100 anos a partir de uma amostra de expectoração de um doente com tuberculose e classificada como a estirpe-tipo de *M. tuberculosis* em 1972 por Kubica *et al.* (77). A sua popularidade deve-se ao facto desta estirpe manter a mesma capacidade e estabilidade, no que respeita à sua virulência, que possuía quando foi inicialmente caracterizada. É extensivamente utilizada para os estudos de investigação em tuberculose, como referência para a padronização das concentrações críticas dos antibacilares utilizados no tratamento da tuberculose e como controlo de qualidade para os testes de susceptibilidade aos antibacilares. Por estes motivos, a estirpe H37Rv foi a eleita para a caracterização completa do genoma de *M. tuberculosis* (28).

A outra estirpe escolhida para o nosso estudo, 359/03, é um isolado clínico que possui uma mutação no gene *rpoB*, gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase. Esta mutação, S531L, é a predominante entre os isolados clínicos que apresentam resistência à rifampicina, quer em Portugal (183), quer a nível mundial (59,126). Por outro lado, esta mutação é estável, conferindo ao microrganismo que a possui uma maior capacidade de adaptação com reduzido, ou mesmo sem qualquer impacto no seu “fitness” (49). Por último, esta estirpe pertence à Família Lisboa de *M. tuberculosis* (I.

Portugal, comunicação pessoal). Assim, ao escolher uma estirpe clínica de *M. tuberculosis* da Família Lisboa, monorresistente à rifampicina e com a mutação S531L no gene *rpoB*, pretende-se ser capaz de transpor os resultados e conclusões obtidos neste trabalho para a realidade das estirpes de *M. tuberculosis* prevalentes no nosso País.

2.1.2 Outro material biológico

O marcador GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas International Inc., Ontário, Canadá) foi usado para o cálculo do peso molecular dos produtos de PCR.

Os “primers” utilizados no decurso da caracterização genética das estirpes, por PCR, encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados para a amplificação por PCR dos genes em estudo e tamanho esperado de cada fragmento, em pares de bases (pb).

“Primers”	Sequência nucleotídica (5’- 3’)	Fragmento (pb)	Referência
“Outer primer” (OP1) *	GAGAATTCGGTCGGCGAGCTGATCC	410	37
“Outer primer” (OP2) *	CGAAGCTTGACCCGCGCGTACACC		
“Inner primer” (IP1) *	GGTCGGCATGTCGCGGATGG	260	37
“Inner primer” (IP2) *	GCACGTCGCGGACCTCCAGC		
<i>katG_Fw</i>	TGGGAGCCCGATGAGGTCTA	803	Este trabalho
<i>katG_Rv</i>	AGGCTGGCAATCTCGGCTTC		
<i>mmpL7_Fw</i> (Rv2942)	TACCCAAGCTGGAAACAA	214	Este trabalho
<i>mmpL7_Rv</i> (Rv2942)	CCGTCAGAATAGAGGAACCAG		
<i>tap_Fw</i> (Rv1258c)	AGTTATAGATCGGCTGGATG	268	Este trabalho
<i>tap_Rv</i> (Rv1258c)	GTGCTGTTCCCGAAATAC		
<i>P55_Fw</i> (Rv1410c)	AGTGGGAAATAAGCCAGTAA	198	Este trabalho
<i>P55_Rv</i> (Rv1410c)	TGGTTGATGTCGAGCTGT		

* “Primers” utilizados pelo “kit” INNOLiPA Rif. TB (Innogenetics, Ghent, Bélgica).

A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina. FW: forward; RV: reverse.

Tabela 3. (Cont.).

“Primers”	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Fragmento (pb)	Referência
<i>efpA_Fw</i> (Rv2846c)	ATGGTAATGCCTGACATCC	131	Este trabalho
<i>efpA_Rv</i> (Rv2846c)	CTACGGGAAACCAACAAAG		
<i>mmr_Fw</i> (Rv3065)	AACCAGCCTGCTCAAAAG	221	Este trabalho
<i>mmr_Rv</i> (Rv3065)	CAACCACCTTCATCACAGA		
<i>16S_Fw</i>	CAAGGCTAAAACTCAAAGGA	197	Este trabalho
<i>16S_Rv</i>	GGACTTAACCCAACATCTCA		

A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina. FW: forward; RV: reverse.

2.1.3 Meios de cultura, soluções e enzimas

A composição e modo de preparação dos meios de cultura, soluções e enzimas utilizados ao longo do trabalho encontram-se descritos nas Tabelas 4 a 12.

Todos os meios de cultura e soluções foram preparados com água bidestilada e, quando necessário, esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos, excepto quando indicado em contrário.

Tabela 4. Composição dos meios de cultura utilizados.

Meio de Cultura	Composição (por litro)
BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube ⁽¹⁾	110 µl Indicador fluorescente ⁽²⁾ 5,9 g Base de meio líquido MB 7H9 (ver abaixo) modificado 1,25 g Peptona de Caseína
BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Medium ⁽¹⁾	110 µl Indicador fluorescente ⁽²⁾ ; 5,9 g Base de meio líquido MB 7H9 modificado; 1,25 g Peptona de Caseína
BBL™ Lowenstein-Jensen Medium ⁽¹⁾ (LJ)	6 g Asparagina; 4 g Fosfato de monopotássio; 0,4 g Sulfato de Magnésio; 1 g Citrato de magnésio; 50 g Farinha de batata; 0,67 g Verde de malaquite
BACTEC™ 12B ⁽¹⁾ (MB 7H12)	4,7 g MB 7H9; 1 g Caseína hidrolizada; 5 g Albumina sérica bovina; 48000 Unidades de catalase; 1000 µCuries de substrato ¹⁴ C (ácido palmítico)
Difco™ Middlebrook 7H9 broth ⁽³⁾ (MB 7H9)	0,5 g Sulfato de amónio; 0,5 g Ácido L- glutamina; 0,1 g Citrato de sódio; 1 mg Piridoxina; 0,5 mg Biotina; 2,5 g Fosfato dissodico; 1 g Fosfato monopotassico; 0,04 g Citrato de amónio férrico; 0,05 g Sulfato de magnésio; 0,5 mg Cloreto de cálcio; 1 mg Sulfato de zinco; 1 mg Sulfato de cobre

(1) Becton and Dickinson, Sparks, MD, EUA; fornecidos previamente preparados e esterilizados. (2) Tris 4,7-difenil-1, pentahidrato de cloreto de ruténio de 10-fenantrolina. (3) DIFCO, Madrid, Espanha.

Tabela 4. (Cont.)

Meio de Cultura	Composição (por litro)
Difco™ Middlebrook 7H11 ⁽³⁾ (MB 7H11)	0,05 g Sulfato de magnésio; 0,04 g Citrato de amónio férrico; 0,4 g Citrato de sódio; 0,5 g Sulfato de amónio; 0,5 g Glutamato monosodico; 1,5 g Fosfato dissodico; 1,5 g Fosfato monopotassico; 13,5 g Agar; 1 mg Piridoxina; 1 mg Sulfato de zinco; 1 mg Sulfato de cobre; 0,5 mg Biotina; 0,5 mg Cloreto de cálcio; 0,25 g Verde de malaquite; 100 ml OADC; 5 ml Glicerol; 1 g de Caseína pancreática digerida

(3) DIFCO, Madrid, Espanha.

Tabela 5. Composição dos suplementos de crescimento utilizados.

Suplemento de crescimento ⁽¹⁾	Composição (por litro)
BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Supplement	50 g Albumina bovina; 20 g Dextrose; 0,03 g Catalase; 0,1 g Ácido oleico
BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Supplement	50 g Albumina bovina; 20 g Dextrose; 0,03 g Catalase; 1,1 g Estearato de polioetileno (POES); 0,1 g Ácido oleico
BBL™ Middlebrook OADC Enrichment	8,5 g Cloreto de sódio; 50 g Albumina bovina (fracção V); 20 g Dextrose; 0,03 g Catalase; 0,6 ml Ácido oleico

(1) Becton and Dickinson; fornecidos previamente preparados e esterilizados.

Tabela 6. Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizadas nos testes de susceptibilidade e no processo de adaptação.

Antibiótico	Fármaco liofilizado ⁽¹⁾ (µg)	Preparação da solução de trabalho
Estreptomicina (STR)	332	Reconstituídos com 4 ml de água destilada estéril
Isoniazida (INH)	33,2	
Rifampicina (RIF)	332	
Etambutol (EMB)	1660	
Pirazinamida (PZA)	20000	Reconstituído com 2,5 ml de água destilada estéril

(1) Becton and Dickinson.

Tabela 7. Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizadas na determinação de concentrações mínimas inibitórias.

Antibiótico ⁽¹⁾	Composição/Preparação das soluções “stock”
Rifampicina	100 mg/ml e 43 mg/ml em DMSO ⁽²⁾ Diluição em DMSO
Isoniazida	25 mg/ml e 5 mg/ml em água bidestilada estéril Diluição em fluido de diluição ou meio MGIT

(1) Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA; (2) Merck, Darmstadt, Alemanha. Soluções “stock” preparadas no dia da experiência, de acordo com a gama de concentrações a testar.

Tabela 8. Composição e modo de preparação das soluções de inibidores de bombas de efluxo utilizadas.

Inibidores de bombas de efluxo ⁽¹⁾	Composição/Preparação das soluções “stock”
Tioridazina (TZ)	10 mg/ml em água bidestilada estéril Diluição em água destilada Protegida da luz (fotosensível)
Verapamil (VP)	100 mg/ml em água bidestilada estéril Diluição em água destilada

(1) Sigma-Aldrich. Soluções “stock” preparadas no dia da experiência.

Tabela 9. Composição e modo de preparação das soluções utilizadas no teste da catalase.

Solução	Composição (por litro)
Mistura de água oxigenada (H ₂ O ₂) ⁽¹⁾ e Tween 80 ⁽²⁾	500 ml H ₂ O ₂ a 30% 500 ml Tween 80 a 10%

(1) Merck; (2) DIFCO.

Tabela 10. Composição e modo de preparação de soluções tampão utilizadas.

Solução	Composição (por litro)
TE	10 mM Tris Base ⁽¹⁾ , pH 8,0; 1 mM EDTA ⁽²⁾ pH 8,0
TAE	242 g Tris Base ⁽¹⁾ ; 57,1 ml ácido acético glacial ⁽³⁾ , 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; Solução “stock” a 50X

(1,2) Sigma-Aldrich; (3) Pronalab, Chile.

Tabela 11. Enzimas utilizadas.

Solução	Composição (por litro)
Lisozima ⁽¹⁾	10 mg/ml em água bidestilada estéril
Proteinase K ⁽²⁾	Solução “stock” a 20 mg/ml

(1) Sigma-Aldrich; (2) Qiagen, Hilden, Alemanha.

Tabela 12. Soluções de corantes utilizadas.

Solução	Composição (por litro)
Fucsina de Ziehl	10 g Fucsina Diamond ⁽¹⁾ ; 5% Fenol ⁽²⁾ ; 100 ml Metanol ⁽³⁾
Azul-de-metileno	3 g Azul-de-metileno ⁽¹⁾ ; 300 ml Etanol ⁽⁴⁾

(1) JT Baker, Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, USA; (2) Scharlau Chimie SA, Barcelona, Espanha; (3) Merck; (4) Panreac, Barcelona, Espanha.

2.2 Métodos

Para a realização deste trabalho todas as manipulações foram realizadas em condições de assépsia. Exceptuando os procedimentos de biologia molecular (PCR e hibridação), todo o trabalho foi realizado no laboratório de segurança de nível III (P3) da Unidade de Ensino e Investigação de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e o processamento e manuseamento de material biológico foi efectuado numa câmara de fluxo laminar tipo II (NU-425-600E; Nuair Biological Safety Cabinets, Plymouth, USA). Todo o material utilizado foi descontaminado em autoclave de dupla entrada (Amaro 2000; AJ Costa, Portugal).

O crescimento das culturas, testes de susceptibilidade, determinação de concentrações mínimas inibitórias e o processo de adaptação das estirpes aos antibióticos foram realizados no sistema fluorimétrico BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton and Dickinson, Sparks, MD, EUA), utilizando o “software” de gestão de dados Epicenter V5.53A

equipado com o módulo TB eXIST (“eXtended Individual Susceptibility Testing”) (Becton and Dickinson). A determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) foi realizada também em paralelo no sistema BACTEC 460-TB (Becton and Dickinson), utilizado como referência.

2.2.1 Crescimento das estirpes

2.2.1.1 Sistema BACTEC™ MGIT™ 960

O BACTEC™ MGIT™ 960 é sistema automático de cultura de micobactérias em meio líquido cujo princípio se baseia na detecção do consumo de oxigénio (O₂) por fluorescência, como indicador de crescimento micobacteriano. Para o crescimento micobacteriano são utilizados tubos indicadores de crescimento (BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube), que contêm 7 mililitros de meio MB 7H9 modificado, uma atmosfera com 10% de CO₂, e um fluorocromo (ruténio) impregnado na base do tubo. Este fluorocromo é o indicador de crescimento da micobactéria, cujo metabolismo causa uma diminuição da concentração de oxigénio no meio, resultando na emissão de fluorescência. Deste modo, a intensidade da fluorescência é directamente proporcional à quantidade de oxigénio consumido (148).

Os tubos MGIT são normalmente incubados a 37°C no sistema BACTEC™ MGIT™ 960 (que funciona como uma estufa). A monitorização do crescimento, *i.e.* a detecção do aumento de fluorescência, é realizada sob luz ultra violeta (UV) a cada 60 minutos e convertida em unidades de crescimento (GU, do inglês “Growth Units”). Um resultado positivo (valores \geq a 75 GU) é indicado no aparelho através da emissão de um sinal sonoro. Um tubo inoculado com *M. tuberculosis*, com resultado positivo no instrumento, contém cerca de 10⁵ a 10⁶ unidades formadoras de colónias por mililitro (CFU, do inglês “Colony Forming Units”). A informação sobre o tempo de detecção (TTD, do inglês “Time To Detection”) para uma cultura positiva é obtida na forma de um relatório que é fornecido pelo sistema. A incubação é realizada até um máximo de 45 dias, após os quais as culturas são declaradas como negativas pelo próprio

instrumento. Uma vez que é um sistema de cultura em meio líquido, é importante adicionar à cultura primária um suplemento antimicrobiano (MGIT PANTA™; Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidixico, Trimetropim e Azlocilina) para suprimir o crescimento de microrganismos contaminantes. Este é reconstituído com suplemento de crescimento SIRE de modo a aumentar a probabilidade de crescimento.

A cultura primária das estirpes H37Rv e 359/03 foi realizada em 7 ml de meio MGIT, com 0,2 ml de inóculo e 0,8 ml de PANTA. As subculturas de ambas as estirpes foram realizadas do mesmo modo, no entanto, o suplemento antimicrobiano PANTA foi substituído por suplemento de crescimento SIRE. A incubação das culturas foi efectuada a 37°C no sistema BACTEC™ MGIT™ 960. De modo a garantir a presença, em cultura, do número de células necessário, para a realização dos testes de susceptibilidade, as culturas apenas foram retiradas do aparelho após terem atingido valores de GU entre 100 e 200.

2.2.1.2 Sistema BACTEC 460-TB

O sistema BACTEC 460-TB (Becton and Dickinson), é um sistema radiométrico semi-automático, utilizado para o isolamento de micobactérias, diferenciação do complexo *M. tuberculosis* e realização de testes de susceptibilidade aos antibacilares. Para o crescimento micobacteriano são utilizados frascos hermeticamente fechados, que contêm 4 ml de meio MB 7H12. Este meio inclui um substrato radioactivo, o ácido palmítico marcado com ¹⁴C, que vai ser hidrolisado pela micobactéria, sendo o crescimento detectado através da medição da libertação de CO₂ radioactivo (145). O sistema BACTEC 460-TB lê e regista a radioactividade libertada convertendo-a num índice de crescimento (GI, do inglês “Growth Index”) numa escala que varia de 0 a 999. O aumento dos valores de GI é directamente proporcional ao crescimento micobacteriano que se verifica nos frascos 12B (145).

Estes frascos são incubados a 37°C numa estufa (Modelo 600, Memmert) e lidos no sistema através de um sistema de injeção com agulhas. Devido ao metabolismo das

micobactérias presentes na cultura, ocorre libertação de $^{14}\text{CO}_2$ para a atmosfera do frasco. Este é aspirado do frasco e a radioactividade é determinada. A introdução de 5% de CO_2 após a leitura de cada frasco vai potenciar o crescimento das micobactérias presentes. Quando é introduzido um agente inibidor de crescimento no meio de cultura, a inibição do metabolismo micobacteriano é indicado pela redução da produção de $^{14}\text{CO}_2$ quando comparado com o tubo controlo ao qual não foi adicionado qualquer agente inibidor. Tal como para o sistema fluorimétrico BACTEC 960 é importante adicionar à cultura primária um suplemento antimicrobiano (BACTECTM PANTATM PLUS Kit; PANTA, Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidixico, Trimetropim e Azlocilina) (Becton Dickinson) para suprimir o crescimento de microrganismos contaminantes. De modo a potenciar o crescimento das micobactérias é utilizada uma substância promotora de crescimento (POES; Polyoxyethylene stearate) que se encontra incorporada no fluido de reconstituição do suplemento antimicrobiano PANTA. A leitura dos frascos 12B está dependente do operador e necessita de ser realizada diariamente e aproximadamente à mesma hora. Semanalmente é realizado um teste de desempenho do aparelho BACTEC 460-TB para o qual 0,2 ml de uma solução standard de ^{14}C é injectado num frasco de ácido (“acid vial”) providenciado pelo “kit” BACTECTM PTK (Becton Dickinson) e agitado vigorosamente durante aproximadamente 30 segundos de modo a libertar uma quantidade conhecida de $^{14}\text{CO}_2$. Como resultado deste teste devem ser sempre obtidos valores de GI entre 50 e 60. Para além disso todos os frascos 12B que irão ser utilizados são testados antes de serem inoculados devendo apresentar valores de GI inferiores a 10, devendo ser descartados se tal não se verificar (145).

As culturas primárias foram efectuadas nos frascos 12B, com 0,1 ml de inóculo das estirpes e 0,1 ml de suplemento antimicrobiano PANTA. As subculturas de ambas as estirpes foram efectuadas com 0,1 ml de inóculo. A incubação foi efectuada a 37°C em estufa e as leituras realizadas diariamente até atingir valores de GI de 999.

2.2.2 Coloração de Ziehl - Neelsen e controlo de contaminação

A coloração de Ziehl - Neelsen foi efectuada em todas as culturas obtidas. Através desta, foi possível avaliar a capacidade de coloração dos bacilos que poderá sofrer alteração durante a exposição ao antibiótico. Este método permite também observar o efeito exercido pelos antibióticos na morfologia das células.

O procedimento incluiu a realização de esfregaços em lâmina (≈ 20 mm por 10 mm de tamanho), fixados à chama. Estes foram de seguida cobertos com fucsina fenicada que por sua vez foi aquecida até à emissão de vapores, deixando-se actuar durante 10 minutos. Após este período, as lâminas foram lavadas com água corrente e descoradas com ácido sulfúrico (Pronalab) a 25% e etanol (96-100%). Por fim, utilizou-se o azul-de-metileno como agente contrastante. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com a objectiva de imersão.

Para além do acima referido, a coloração permitiu também avaliar a eventual ocorrência de contaminações das culturas por outras bactérias ou fungos durante o processo de adaptação. Para além disso, todas as culturas obtidas durante este trabalho foram plaqueadas em gelose de sangue (“Columbia III Agar with 5% Sheep Blood”, Becton Dickinson). As culturas seleccionadas para os testes fenotípicos e genotípicos, para além da placa de gelose de sangue, foram também inoculadas em meio Lowenstein-Jensen (LJ) com realização de nova observação microscópica para confirmação dos resultados anteriormente obtidos.

2.2.3 Manutenção das estirpes

As culturas crescidas em meio líquido e sólido foram mantidas a -80°C em 10% de Skim Milk (DIFCO; esterilizado em autoclave durante 10 minutos) (112). Resumidamente, as culturas foram centrifugadas com refrigeração a 4°C (Rotanta 46R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha) durante 30 minutos a 3500 rpm. O “pellet”

foi ressuspendido em 500 µl do sobrenadante, transferido para criotubos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) aos quais foi acrescentado 500 µl de Skim Milk a 20%.

2.2.4 Caracterização fenotípica das estirpes em estudo

A caracterização fenotípica das estirpes foi efectuada através da realização do teste de susceptibilidade aos cinco antibacilares de primeira linha (estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida), utilizando o sistema BACTEC™ MGIT™ 960, determinação de CMI com os sistemas BACTEC MGIT 960 e BACTEC 460-TB e determinação semi-quantitativa da actividade da catalase através do teste de tolerância ao calor.

2.2.4.1 Teste de susceptibilidade aos antibacilares

O teste de susceptibilidade para *M. tuberculosis* realizado com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 é um procedimento rápido e qualitativo para o estabelecimento do perfil de susceptibilidade aos antibacilares testados na sua concentração crítica (Tabela 13). A concentração crítica é definida como a concentração necessária para eliminar cerca de 99% da população da estirpe controlo, H37Rv, que nunca esteve em contacto com o antibacilar. Considera-se que uma estirpe é susceptível a determinado antibacilar, testado na sua concentração crítica, quando a proporção de micobactérias resistentes presentes na cultura não excede 1%.

Tabela 13. Concentrações críticas utilizadas para o teste de susceptibilidade aos antibacilares de primeira linha (67)

Antibacilar	Concentração Crítica
Estreptomicina	1,0 µg/ml
Isoniazida	0,1 µg/ml
Rifampicina	1,0 µg/ml
Etambutol	5,0 µg/ml
Pirazinamida	100 µg/ml

Existem vários métodos para a realização de testes de susceptibilidade, sendo o mais utilizado o método das proporções, no qual a resistência clínica é estabelecida quando o número de bactérias resistentes ao fármaco testado for superior a 1%, quando comparado com o tubo controlo ao qual não foi adicionado o fármaco. O teste de susceptibilidade realizado com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 foi estabelecido com base em fundamentos semelhantes. O aumento da fluorescência devido ao consumo de oxigénio que se verifica à medida que ocorre o crescimento e metabolismo micobacteriano é medido automaticamente e designado por unidades de crescimento (GU). Quando o controlo atinge 400 GU é feita a comparação entre os tubos que contêm o antibacilar e o tubo controlo sem antibacilar estabelecendo a proporção de micobactérias resistentes presentes no tubo. Se o antibacilar adicionado ao tubo com a estirpe a testar inibir o crescimento, então pouco ou nenhum oxigénio irá ser consumido, logo pouca ou nenhuma fluorescência irá ser detectada (148).

O sistema BACTEC™ MGIT™ 960 utiliza dois “kits” de susceptibilidade diferentes, o BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE e o BACTEC™ MGIT™ 960 PZA. O “kit” SIRE foi desenvolvido para testar a susceptibilidade à estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol e o “kit” PZA foi desenvolvido para o teste de susceptibilidade à pirazinamida. Para a realização do teste de susceptibilidade à pirazinamida é utilizado um meio de cultura em tudo semelhante ao meio MGIT apenas com alteração do pH do meio, que é de 5,9 enquanto que no “kit” SIRE é de 6,8. O teste de susceptibilidade com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 é um teste qualitativo que varia entre 4 a 12 dias

para o teste de susceptibilidade SIRE e entre 4 a 21 dias para o teste de susceptibilidade à PZA. O método consiste na comparação da taxa de crescimento de um tubo MGIT sem antibiótico e inoculado com uma diluição 1/100 (1/10 no teste de susceptibilidade à PZA) da mesma suspensão da amostra que é inoculada nos tubos com antibiótico na concentração crítica. Isto permite saber se nos tubos inoculados com antibiótico, onde a proporção bacilar é 100 vezes superior à do tubo controlo, existe uma percentagem superior ou igual a 1% de bacilos resistentes. Desta forma é possível obter uma curva de crescimento idêntica à do tubo controlo, nos tubos com a concentração crítica do antibacilar testado. Esta comparação é realizada automaticamente pelo algoritmo de cálculo do sistema BACTEC™ MGIT™ 960, apresentando um resultado final de susceptível ou resistente.

Teste de susceptibilidade SIRE

Para o teste de susceptibilidade SIRE foram utilizados cinco tubos MGIT nomeadamente um tubo para o controlo de crescimento e quatro tubos para cada fármaco a testar. As culturas, com GU entre 100 e 200, foram utilizadas directamente para inoculação. As culturas com valores de GU entre 200 e 4000 são diluídas em soro fisiológico estéril para valores de GU entre 100 e 200. Culturas com valores de GU superiores a 4000 não foram utilizadas, sendo necessária a realização de uma nova subcultura. A cada tubo MGIT foi adicionado, com uma seringa de insulina, 0,8 ml de suplemento SIRE, 0,1 ml de cada antibiótico, excepto no tubo controlo, e 0,5 ml de cultura. O tubo controlo foi inoculado com 0,8 ml de suplemento SIRE e 0,5 ml de uma suspensão diluída 1/100 da cultura inicial. A diluição 1/100 foi efectuada em soro fisiológico estéril.

Teste de susceptibilidade à PZA

Para o teste de susceptibilidade à PZA foram utilizados dois tubos de meio PZA, nomeadamente um tubo para o controlo de crescimento e um tubo para o fármaco a

testar. As culturas foram utilizadas conforme os critérios definidos para o teste de susceptibilidade SIRE. A cada tubo de meio PZA foi adicionado, com uma seringa, 0,8 ml de suplemento PZA, 0,1 ml de antibiótico, excepto no tubo controlo, e 0,5 ml de cultura. O tubo controlo foi inoculado com 0,8 ml de suplemento PZA e 0,5 ml de uma suspensão diluída 1/10 da cultura inicial. A diluição 1/10 foi efectuada em soro fisiológico estéril.

2.2.4.2 Teste de susceptibilidade aos antibacilares na presença de inibidores de bombas de efluxo

O teste de susceptibilidade aos antibacilares na presença de inibidores de bombas de efluxo foi realizado apenas para isoniazida conforme o procedimento descrito em 2.2.4.1. De modo a garantir a viabilidade celular a concentração de composto utilizada correspondeu a metade do valor da sua concentração mínima inibitória (181,184,185).

2.2.4.3 Determinação de concentrações mínimas inibitórias

A determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMIs) foi realizada pelo método de macrodiluição com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 tendo como referência a determinação das mesmas com o sistema BACTEC 460-TB. A determinação das CMIs foi efectuada tendo como base o princípio subjacente as testes de susceptibilidade aos antibacilares, *i.e.* o método das proporções (ponto 2.2.4.1).

2.2.4.3.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias, para a isoniazida e rifampicina, com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960

As CMIs das estirpes a testar foram determinadas em meio MGIT contendo diferentes concentrações do antibiótico a testar. Os tubos MGIT foram inoculados com 0,8 ml de suplemento SIRE, 0,1 ml do antibiótico a testar e 0,5 ml de cultura (GU entre 100 e

200) e incubados a 37°C. Para cada ensaio foram incluídos dois controlos, um controlo absoluto inoculado apenas com 0,8 ml de suplemento SIRE e 0,5 ml de cultura, e um controlo proporcional inoculado com 0,8 ml de suplemento SIRE e 0,5 ml de uma suspensão da cultura inicial diluída 1/100 em soro fisiológico estéril. A validação da determinação das concentrações mínimas inibitórias foi efectuada por comparação entre os tempos de crescimento dos controlos absoluto e proporcional.

As diluições dos antibióticos foram realizadas por diluição seriada por um factor de dois, em meio MGIT. A gama de concentrações testada para a isoniazida foi de 0,025 a 0,8 µg/ml em ambas as estirpes. A gama de concentrações testada para a rifampicina foi de 0,125 a 4 µg/ml para a estirpe H37Rv e de 32 a 256 µg/ml para a estirpe 359/03. A gama de concentrações a testar foi seleccionada com base no conhecimento prévio sobre os padrões de susceptibilidade das estirpes para os dois antibióticos em estudo. Para as estirpes adaptadas à isoniazida, a gama de concentrações de isoniazida utilizada variou entre 1 a 256 µg/ml. Para as estirpes H37Rv adaptadas à rifampicina, a gama de concentrações de rifampicina testada variou desde 0,125 a 4 µg/ml e para as estirpes 359/03 a escala de concentrações de rifampicina aplicada variou entre 64 a 512 µg/ml. A análise dos resultados foi efectuada com o “software” Epicenter/TB eXIST (ver ponto 2.2.9).

2.2.4.3.2 Determinação de concentrações mínimas inibitórias, para a isoniazida e rifampicina, com o sistema BACTEC 460-TB

As CMIs foram testadas nos frascos 12B contendo diferentes concentrações do antibiótico a testar. A cultura inicial foi diluída 1/2 em fluído de diluição (BACTECTM Diluting Fluid; Becton Dickinson). Os frascos foram inoculados com 0,1 ml do antibiótico e 0,1 ml da suspensão diluída 1/2 e incubados a 37°C. Para cada ensaio foram efectuados dois controlos, um controlo absoluto inoculado apenas com 0,1 ml da suspensão diluída 1/2 e um controlo proporcional. Para este, a suspensão diluída 1/2 foi novamente diluída 1/100 e desta segunda suspensão retirou-se 0,1 ml para inocular o frasco 12B.

As diluições dos antibióticos foram efectuadas com fluído de diluição, e seriadas por um factor de dois. A gama de concentrações testada para a isoniazida e rifampicina nas estirpes a testar foi a utilizada no ponto 2.2.4.3.1.

A interpretação de resultados foi baseada na taxa de crescimento, determinada pela variação entre o valor de GI no final do teste e o valor de GI do dia anterior (Δ GI). O valor de Δ GI foi comparado entre o frasco controlo e os frascos que contêm o antibiótico. Valores negativos de Δ GI indicam um decréscimo no crescimento enquanto que valores de Δ GI positivos indicam um aumento do crescimento micobacteriano. Assim, se a variação do frasco que contém o antibiótico for superior à do frasco controlo, este é considerado resistente. Para culturas susceptíveis o valor de Δ GI deve ser menor do que o do frasco controlo. Quando o frasco controlo atinge os 30 GI os resultados foram interpretados como se segue:

Δ GI (controlo) > Δ GI (antibiótico) – Susceptível

Δ GI (controlo) < Δ GI (antibiótico) – Resistente

Δ GI (controlo) = Δ GI (antibiótico) – Intermédio

2.2.4.3.3 Determinação de concentrações mínimas inibitórias para inibidores de bombas de efluxo

A determinação das CMIs das estirpes a testar para os compostos inibidores de bombas de efluxo tioridazina e verapamil, foi realizada com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960, conforme descrito no ponto 2.2.4.3.1. As diluições dos compostos foram realizadas por diluição seriada por um factor de dois em água destilada estéril. A gama de concentrações testada para a tioridazina foi de 3,75 a 60 μ g/ml em ambas as estirpes. A gama de concentrações testada para o verapamil foi de 16 a 512 μ g/ml, também para ambas as estirpes.

2.2.4.3.4 Determinação de concentrações mínimas inibitórias na presença de inibidores de bombas de efluxo

O efeito inibitório dos compostos inibidores de bombas de efluxo, tioridazina e verapamil, foi avaliado através da determinação das CMI's da isoniazida na presença destes compostos. De modo a garantir a viabilidade celular a concentração de composto utilizada corresponde a metade do valor da concentração mínima inibitória (181,184,185). A determinação das concentrações mínimas inibitórias foi realizada com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960, conforme descrito no ponto 2.2.4.3.1, ao qual se acrescentou a cada tubo 0,1 ml do inibidor a testar (correspondendo a concentrações finais de 7,5 µg/ml de tioridazina e 128 µg/ml de verapamil).

2.2.4.4 Teste de tolerância ao calor para a detecção da actividade da catalase nas estirpes em estudo

A catalase é uma enzima intracelular e solúvel, capaz de gerar água e oxigénio a partir do peróxido de hidrogénio. Virtualmente, todas as micobactérias possuem esta enzima activa, excepto certas estirpes de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida e *M. bovis*. O complexo *M. tuberculosis* pode ser separado das restantes micobactérias por apresentar a enzima inactiva a 68°C.

Existem dois tipos de teste para a detecção da actividade da catalase, o teste semi-quantitativo, que reflecte as diferenças na cinética enzimática, e o teste de tolerância ao calor que estuda a actividade catalásica à temperatura ambiente e a 68°C (35). Como quase todas as micobactérias produzem catalase, o que varia é a quantidade de catalase produzida ou a capacidade de produzir catalase a 68°C. Uma vez que algumas estirpes de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida se apresentam como catalase negativas à temperatura ambiente, neste trabalho foi utilizado o teste de tolerância ao calor.

Para a realização do teste, 0,2 ml das culturas a testar foram inoculados em meio de LJ, com uma seringa e estes incubados a 37°C na estufa, em posição horizontal, durante

aproximadamente três semanas. Após as três semanas de incubação, foram retiradas, com uma ansa estéril, colónias de bactérias que foram posteriormente emulsionadas em 0,5 ml de água destilada estéril em tubos de ensaio com rosca. Foram efectuadas duas suspensões de cada estirpe e incubadas, uma à temperatura ambiente e outra a 68°C em banho de água, durante vinte minutos. Findo este tempo, permitiu-se que a cultura previamente incubada a 68°C arrefecesse até atingir a temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados a cada tubo 0,5 ml de uma mistura em partes iguais de H₂O₂ a 30% e Tween 80 a 10%. Foi observada a formação, ou não, de bolhas, tendo o cuidado de não agitar os tubos devido à possível formação de bolhas pelo Tween 80. Os resultados negativos foram registados após vinte minutos da adição da mistura H₂O₂ e Tween 80.

2.2.5 Caracterização genotípica das estirpes em estudo

A caracterização genotípica das estirpes a testar foi realizada com o auxílio de métodos moleculares de identificação sob a forma de sistemas comerciais, nomeadamente, o sistema de sondas *Accuprobe*, que é o método de referência para a identificação do complexo *M. tuberculosis*, o sistema GenoType MTBC para identificação ao nível de espécie, de detecção dos determinantes genéticos de resistência à isoniazida e rifampicina (INNOLiPA Rif. TB e GenoType MTBDR*plus*). Foi ainda analisada por PCR alterações no gene *katG*. Nas estirpes para as quais foi detectada actividade de bombas de efluxo, o nível de expressão génica para os genes que codificam para as principais bombas de efluxo descritas em *M. tuberculosis* foi quantificado por qRT-PCR.

2.2.5.1 O sistema de sondas *Accuprobe*

O sistema *Accuprobe*® Culture Identification Test (Genprobe, California, EUA) é um sistema de sondas de DNA utilizado para a identificação de micobactérias partir de cultura (79). Este método baseia-se no ensaio de protecção de hibridação (HPA, do

inglês “Hybridization Protection Assay”) utilizando sondas de DNA marcadas com éster de acridina, um composto quimioluminescente (88).

As sondas de DNA utilizadas apresentam-se em cadeia simples e são completamente complementares à cadeia de rRNA da micobactéria a identificar. Após a libertação do RNA da micobactéria (por lise ultra sónica) promovem-se, em banhos-maria secos, condições de desnaturação dos ácidos nucleicos e hibridação com a sonda marcada. Esta liga-se à zona complementar do RNA alvo, formando um híbrido DNA-RNA marcado, que é lido num luminómetro após a indução química da luminescência. O reagente de selecção possibilita a eliminação da sonda que não hibridou, não danificando a sonda que hibridou. Deste modo, apenas serão detectadas as sondas cujo éster de acridina se encontra protegido no interior do híbrido.

Para a preparação do RNA das culturas a identificar retiraram-se 1000 µl das culturas em meio líquido e centrifugaram-se durante 10 minutos a 13000 rpm (Biofuge *pico* Heraeus, DJB Labcare Ltd, Reino Unido). Após a centrifugação, descartaram-se 900 µl do sobrenadante e ressuspendeu-se o “pellet” nos restantes 100 µl, que foram posteriormente transferidos para os tubos de lise. A estes juntou-se 100 µl de reagente de hibridação. De seguida procedeu-se à lise das células, inicialmente por lise ultra sónica em sonicador (Genprobe) durante 15 minutos e posteriormente a 95°C em banho seco (Genprobe) durante 10 minutos. De seguida, as amostras foram transferidas para os tubos de sonda e incubadas a 60°C em banho seco (Genprobe) durante 15 minutos. A selecção dos híbridos foi efectuada com 300 µl de reagente de selecção durante 10 minutos a 60°C em banho seco. Após os tubos de sonda atingirem a temperatura ambiente, a leitura de emissão de luz foi efectuada no luminómetro (LEADER™ 50, Genprobe). O resultado foi obtido em unidades relativas de luz (RLU, do inglês “Relative Light Units”) e foram considerados positivos valores de RLU iguais ou superiores ao “cutoff” (30 000 RLU), sendo que qualquer valor abaixo deste foi interpretado como negativo.

2.2.5.2 Sistemas de identificação e rastreamento de mutações baseados na amplificação de ácidos nucleicos

Os sistemas baseados na amplificação de ácidos nucleicos utilizados neste trabalho envolvem três etapas: extração de DNA genômico, amplificação dos fragmentos dos genes alvo por PCR e hibridação reversa em tiras de nitrocelulose.

2.2.5.2.1 Extração de DNA genômico

A extração de DNA das estirpes a testar foi realizada com o QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, EUA). Resumidamente, o método consiste na extração de DNA a partir das suspensões de células segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. A suspensão de células foi centrifugada durante 10 minutos a 13000 rpm (Biofuge *pico* Heraeus, Alemanha), ressuspensa em 1000 µl de tampão TE, misturada no vórtex e centrifugada novamente, durante 10 minutos a 13000 rpm. O “pellet” foi ressuspensa em 200 µl de tampão TE e incubado a 95°C durante 20 minutos. Após a incubação, adicionaram-se 20 µl de 20 mg/ml Proteinase K (Qiagen) e 200 µl de tampão AL (Qiagen) misturando-se no vórtex. As amostras foram incubadas a 56°C durante 10 minutos. De seguida adicionaram-se 200 µl de etanol (96-100%) e a solução foi homogeneizada. As amostras foram então colocadas em colunas QIAamp e lavadas com os tampões de lavagem AW1 e AW2 (Qiagen). As soluções contendo o DNA foram eluídas por centrifugação com 200 µl de tampão AE (Qiagen).

2.2.5.2.2 O teste GenoType MTBC

O sistema de identificação Genotype MTBC (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemanha) baseia-se na tecnologia de sondas de DNA em membrana (DNA•STRIP®) e no princípio da hibridação reversa a partir do produto contendo fragmentos específicos do gene *gyrB*, do gene 23 rRNA e da região RD1, amplificado por “multiplex PCR”. A análise do polimorfismo do gene *gyrB* permite diferenciar todas as espécies do

complexo *M. tuberculosis* (104). *M. bovis* BCG é diferenciado pela identificação da deleção na região RD1 (168). Os fragmentos amplificados do gene 23 rRNA incluem sequências que cobrem as bactérias Gram positivas com um elevado conteúdo de G + C (controlo de amplificação) e sequências específicas para todos os membros do complexo *M. tuberculosis* (132).

A técnica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante estando o procedimento dividido em três etapas. O DNA extraído das estirpes em estudo foi utilizado para amplificar os fragmentos dos genes *gyrB*, 23 rRNA e região RD1 por “multiplex PCR” com “primers” biotinizados (sequência dos “primers” não está disponível). Os produtos resultantes da amplificação do DNA das estirpes em estudo foram posteriormente utilizados nos ensaios de hibridação em membrana.

As misturas de reacção foram preparadas para um volume total de reacção de 50 µl composta por 1x tampão da enzima Taq DNA Polimerase (Fermentas, Ontário, Canadá), 1,75 mM MgCl₂ (Fermentas), 35 µl da mistura de “primers” e nucleótidos (PNM; Hain Lifescience), 1,25 U Taq DNA Polimerase (Fermentas), 5 µl de DNA e água bidestilada. Para cada reacção preparou-se um tubo adicional com todos os reagentes excepto o DNA, o qual serviu de controlo de possíveis contaminações durante a PCR. A manipulação das amostras, preparação das misturas de reacção e processamento dos produtos de PCR foram realizados em espaços físicos separados. A reacção de PCR foi realizada num termociclador Mastercycler Personal Eppendorf® (Eppendorf North America, Inc, EUA), com o seguinte perfil de amplificação: desnaturação inicial a 95°C durante cinco minutos, seguido de desnaturação a 95°C durante 30 segundos e emparelhamento dos “primers” durante dois minutos a 58°C durante 10 ciclos; seguiram-se vinte ciclos com desnaturação a 95°C durante 25 segundos, emparelhamento dos “primers” durante 40 segundos a 53°C e extensão durante 40 segundos a 70°C. A extensão final ocorreu a 70°C durante 8 minutos. Findo este processo, as amostras mantiveram-se a 4°C até serem utilizadas.

Após a reacção de PCR, verificou-se a eficiência da amplificação, bem como a integridade dos produtos de PCR (5 µl) por electroforese em gel de agarose a 2% (p/v)

(Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona) dissolvida em tampão TAE 1X, corado com 0,25 µg/ml de brometo de etídeo (Sigma). A electroforese decorreu a uma voltagem de 90 V durante uma hora com o sistema Pharmacia Biotech GNA 100 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e fonte de alimentação Amersham Pharmacia Biotech EPS 301. A análise dos produtos amplificados foi realizada utilizando-se como parâmetro de comparação o marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus. O resultado da amplificação foi registado sob luz UV pelo sistema GEL DOC XR (Bio-Rad, Milão, Itália).

As condições experimentais utilizadas para a hibridação reversa foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o produto de amplificação foi desnaturado durante cinco minutos à temperatura ambiente, com um agente alcalino. A hibridação do DNA marcado em cadeia simples com as sondas presentes nas tiras de nitrocelulose foi realizada a 45°C em banho-maria. Após a hibridação e lavagens, procedeu-se à detecção colorimétrica, por adição de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina e incubou-se à temperatura ambiente com agitação durante 30 minutos. Para a detecção dos sinais de hibridação, adicionou-se substrato e incubou-se à temperatura ambiente sem agitação até à obtenção dos sinais, período que foi estendido, quando necessário, no máximo até 30 minutos. Terminada a revelação, os resultados foram interpretados com a ajuda de uma matriz fornecida pelo sistema de detecção.

2.2.5.2.3 O teste INNOLiPA Rif. TB

O teste INNOLiPA Rif. TB (Innogenetics, Ghent, Bélgica) baseia-se na amplificação de uma região de 81 pb do gene *rpoB* correspondendo a 27 aminoácidos, onde se situam as mutações responsáveis pela maioria dos fenótipos de resistência à rifampicina (Figura 6).

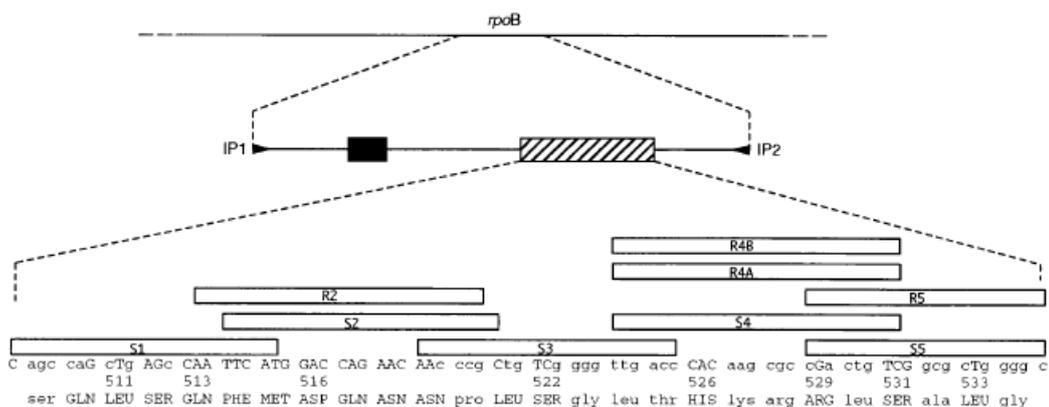


Figura 6. Representação esquemática da região relevante de resistência à rifampicina no gene *rpoB* (codões 509 a 534) e as posições dos “primers” e sondas utilizados no sistema INNOLiPA Rif. TB (adaptado de Rossau *et al.*, 1997 (135)). As setas indicam as posições dos “primers” internos IP1 e IP2. A caixa a preto corresponde à posição da sonda para o complexo *M. tuberculosis*. A caixa preenchida com riscas corresponde à zona onde estão compreendidas as sondas “wild type” (S) e de mutação (R). As sequências nucleotídicas e aminoácidos presentes na região relevante do gene *rpoB* apresentam-se como descritas por Telenti *et al.*, 1993 (169)).

Tal como o teste descrito anteriormente, o teste INNOLiPA Rif. TB baseia-se no princípio da hibridação reversa. Este teste permite a identificação do complexo *M. tuberculosis* e das mutações mais frequentes associadas à resistência à rifampicina a partir de culturas ou directamente a partir de amostras clínicas. De modo a aumentar a sensibilidade da amplificação utilizam-se “primers” externos fornecidos pelo “kit” INNOLiPA Rif. TB Outer, seguida de Nested PCR efectuada com os “primers” internos fornecidos no “kit” INNOLiPA Rif. TB (Tabela 3). Tanto os “primers” externos como os internos encontram-se biotinilados na extremidade 5’; os primeiros dão origem a um fragmento com 410 pb e os segundos a um fragmento com 260 pb. Os produtos amplificados, marcados com biotina são desnaturados e hibridados com sondas oligonucleotídicas específicas incorporadas como bandas paralelas nas tiras de membrana de nitrocelulose.

Depois da hibridação, procede-se à detecção do sinal nas sondas, adicionando-se estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina que após a ligação aos produtos de PCR

hibridados, converte o substrato cromógeno, BCIP/NBT (Bromo-4-Chloro-3-Indolil-Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium), num produto insolúvel castanho/púrpura que se deposita na tira de membrana e que pode ser interpretado visualmente.

A membrana contém uma linha de referência para orientação durante o ensaio de hibridação, um controlo de conjugado que permite avaliar a eficiência da revelação do sinal das sondas hibridadas, uma sonda para a detecção do complexo *M. tuberculosis* (sonda MTB), cinco sondas que detectam o genótipo susceptível (S1 a S5) e quatro sondas que detectam as mutações no gene *rpoB* (R2, R4a, R4b e R5) (Figura 7). O possível genótipo de resistência é definido pela ausência de hibridação com uma ou mais sondas S e, hibridação com a sonda de mutação (R) correspondente. Caso a mutação detectada não esteja coberta pelas sondas de mutação, o genótipo de resistência é estabelecido com base apenas na ausência de hibridação com a(s) sonda(s) S.

Excepções a este padrão surgem principalmente quando existe mais do que uma estirpe na mesma amostra, quando existem mutações múltiplas na mesma estirpe ou quando estamos perante o fenómeno de heterorresistência.

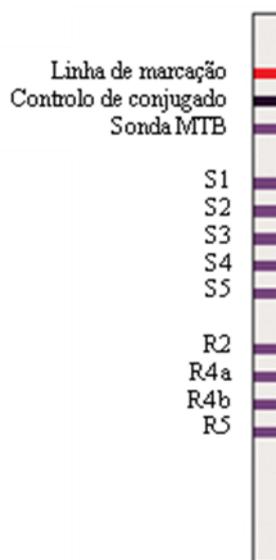


Figura 7. Representação esquemática das diferentes sondas presentes na tira de nitrocelulose do sistema de detecção INNOLiPA Rif. TB.

(adaptado de http://www.innogenetics.com/fotos/LiPA_Rif_TB_Strip.jpg).

A técnica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e o procedimento foi dividido em três etapas. O DNA extraído das estirpes em estudo (ver 2.2.5.2.1) foi utilizado para amplificar, por meio de Nested PCR, a região do gene *rpoB* responsável pela resistência à rifampicina (codões 509 a 534). Para a primeira amplificação, utiliza-se o “kit” INNOLiPA Rif. TB Outer e para a segunda amplificação, o “kit” INNOLiPA Rif. TB Amplification.

Na primeira amplificação, as misturas de reacção foram preparadas para um volume total de reacção de 50 µl composta por 10 µl tampão de amplificação (Innogenetics), 10 µl de solução de MgCl₂ (Innogenetics), 10 µl da mistura de “outer primers” e nucleótidos (Innogenetics), 1 U Taq DNA Polimerase, 5 µl de DNA e água bidestilada. Para cada reacção preparou-se um tubo adicional com todos os reagentes excepto o DNA, o qual serviu de controlo de possíveis contaminações durante a PCR. A reacção de PCR foi realizada com o seguinte perfil de amplificação: desnaturação inicial a 95°C durante um minuto, seguido de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, emparelhamento dos “primers” durante 30 segundos a 62°C e extensão durante trinta segundos a 72°C durante 40 ciclos. A extensão final ocorreu a 72°C durante 10 minutos. Findo este processo, as amostras mantiveram-se a 4°C até serem utilizadas.

Para a segunda reacção de amplificação foi utilizado 1 µl do produto da primeira reacção de PCR e a mistura de “inner primers”. As restantes condições utilizadas para a preparação da mistura de reacção e perfil de amplificação mantiveram-se. A análise dos produtos de PCR foi realizada de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.2.5.2.2.

As condições experimentais utilizadas para a hibridação reversa foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, como descrito no ponto 2.2.5.2.2., excepto na temperatura de hibridação, que neste caso foi de 62°C.

2.2.5.2.4 O teste GenoType MTBDRplus

O teste Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience) baseia-se também na tecnologia de sondas de DNA em membrana e no princípio da hibridação reversa. Este teste permite a identificação do complexo *M. tuberculosis* e das mutações mais frequentes associadas à resistência à isoniazida e rifampicina a partir de culturas ou directamente a partir de amostras clínicas. A identificação da resistência à rifampicina é facultada pela detecção das mutações mais comuns que ocorrem no gene *rpoB* (Tabela 14). Para testar a resistência à isoniazida é examinado o gene *katG*, mais especificamente o codão 315 (Tabela 15), e a região promotora do gene *inhA* (Tabela 16).

Tabela 14. Mutações no gene *rpoB* e as sondas “wild type” e de mutação correspondentes detectadas pelo sistema MTBDRplus.

Sondas “Wild Type”	Codões analisados	Sonda de mutação
<i>rpoB</i> WT1	505-509	
<i>rpoB</i> WT2	510-513	
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517	
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1 (D516V)
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522	
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525	
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A (H526Y)
		<i>rpoB</i> MUT2B (H526D)
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3 (S531L)

Tabela 15. Mutações no gene *katG* e as sondas “wild type” e de mutação correspondentes detectadas pelo sistema MTBDRplus.

Sondas “Wild Type”	Codões analisados	Sonda de mutação
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 (S315T1)
		<i>katG</i> MUT2 (S315T2)

Tabela 16. Mutações na região promotora do gene *inhA* e as sondas “wild type” e de mutação correspondentes detectadas pelo sistema MTBDRplus.

Sondas “Wild Type”	Posição analisada	Sonda de mutação
<i>inhA</i> WT1	- 15	<i>inhA</i> MUT1 (C-15T)
	- 16	<i>inhA</i> MUT2 (A-16G)
<i>inhA</i> WT2	- 8	<i>inhA</i> MUT3A (T-8C)
		<i>inhA</i> MUT3A (T-8A)

A técnica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e o procedimento completo para a detecção da resistência à rifampicina e isoniazida envolve três etapas: extracção de DNA genómico (ver ponto 2.2.5.2.1), amplificação de fragmentos específicos dos gene *rpoB*, *katG*, e da região promotora do gene *inhA* por “multiplex PCR” com “primers” biotinilados na extremidade 5’ e hibridação reversa.

As condições de amplificação, a análise dos produtos de PCR e o procedimento de hibridação foram realizados de acordo com 2.2.5.2.2.

2.2.5.3 Detecção de mutações no gene *katG*

A presença de mutações na região relevante do gene *katG* foi analisada com os “primers” *katG*_Fw e *katG*_Rv (Tabela 3). Estes foram desenhados recorrendo ao programa “Primer 3” (136) utilizando a sequência do gene *katG* com o número de acesso X68081.1, retirado do GenBank na base de dados do NCBI (102) e testados com o programa “In Silico” (97).

As misturas de reacção foram preparadas para um volume total de reacção de 50 µl composta por 1x tampão da enzima Taq DNA Polimerase, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada “primer”, 1,5 U Taq DNA Polimerase, 5 µl de DNA e água bidestilada. Para cada reacção preparou-se um tubo adicional com todos os reagentes excepto o DNA, o qual serviu de controlo de possíveis contaminações durante a PCR. A reacção de PCR foi realizada, com o seguinte perfil de amplificação: desnaturação

inicial a 94°C durante cinco minutos, seguido de desnaturação a 94°C durante um minuto, emparelhamento dos “primers” durante um minuto a 60°C e extensão durante um minuto a 72°C durante 40 ciclos. A extensão final ocorreu a 72°C durante dez minutos. Findo este processo, as amostras mantiveram-se a 4°C até serem utilizadas. A análise dos produtos de PCR foi realizada de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.2.5.2.2.

2.2.6 Extracção de RNA

A extracção de RNA total das estirpes a testar foi realizada com o RNeasy® Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante para a extracção de RNA total de bactérias. No entanto, foi necessário fazer algumas modificações. Resumidamente, a partir de uma cultura com 100 a 200 GU (culturas com valores de GU superiores não foram utilizadas neste procedimento) retiraram-se 1000 µl e centrifugou-se durante 10 minutos a 13000 rpm. Retiraram-se 500 µl do sobrenadante e ressuspendeu-se o “pellet” no volume restante. A esta cultura adicionou-se 1000 µl de “RNAprotect bacteria reagent” (Qiagen) a qual foi posteriormente centrifugada durante 10 minutos a 9000 rpm, o sobrenadante desprezado, o “pellet” ressuspendido em 100 µl de tampão TE, seguido de incubação a 95°C no banho seco durante 10 minutos. Para a lise celular, foi efectuada inicialmente um passo de lise enzimática com lisozima a 3 mg/L durante 10 minutos seguido de lise ultra sónica no sonicador durante 15 minutos. O RNA foi tratado com “RNase-free DNase I”, durante duas horas e quinze minutos, para reduzir a presença de DNA contaminante e posteriormente purificado segundo o protocolo “RNA cleanup” (Qiagen).

2.2.7 Quantificação da expressão de genes que codificam para bombas de efluxo por qRT-PCR

O nível de expressão dos genes que codificam para as principais bombas de efluxo em *M. tuberculosis*, nomeadamente, *mmpL7* (*Rv2942*), *tap* (*Rv1258c*), *P55* (*Rv1410c*), *efpA*

(*Rv2846c*) e *mmr* (*Rv3065*), foi analisado por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR, do inglês “real-time quantitative RT-PCR). Nesta técnica é efectuada uma reacção de transcrição reversa (RT, do inglês “Reverse Transcription”) à qual se segue a amplificação de cDNA por PCR com incorporação de moléculas fluorescentes na cadeia dupla de DNA, as quais podem ser quantificadas em tempo real durante cinética da reacção (64). Os produtos formados são monitorizados em cada ciclo de reacção permitindo uma detecção rápida e específica dos produtos de amplificação. Actualmente é o método que apresenta maior sensibilidade e especificidade para a análise relativa de expressão génica (184,185). Esta técnica necessita de uma normalização para uma leitura adequada dos resultados, uma vez existem diversos factores que podem afectar a eficiência do processo de transcrição e da reacção de PCR, *p.e.* a variabilidade inerente ao RNA e a presença de inibidores (17). Deste modo, para a análise dos dados são utilizados genes, cujo nível de expressão se mantém uniforme na maioria das células independentemente da fase de crescimento e condições de crescimento. Estes são chamados genes de referência e são escolhidos com base no conhecimento da sua função na célula. O fundamento da técnica de PCR em tempo real baseia-se nos valores de C_q (“quantification cycle” ou ciclo de quantificação), isto é, no ciclo onde o produto de PCR atinge um “cutoff” de fluorescência definido. Assim, o valor de C_q indica a fracção do número do ciclo no qual a quantidade de cDNA amplificado atinge um valor de fluorescência fixo. Deste modo, a quantidade de mRNA presente inicialmente na amostra é directamente proporcional à quantidade de cDNA amplificada e é indirectamente proporcional aos valores de C_q obtidos (17).

O gene normalizador, ou de referência, seleccionado para este trabalho foi o rRNA 16S. Os “primers” utilizados para a análise por qRT-PCR encontram-se descritos na Tabela 3 e foram desenhados recorrendo ao programa “Primer 3” e testados com o programa “In Silico”. Para o procedimento de qRT-PCR recorreu-se ao “QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit” (Qiagen), e seguiu-se o protocolo descrito para a sua utilização no termociclador em tempo real Rotor-GeneTM 3000 (Corbett Research, Sydney, Austrália). Cada ensaio de qRT-PCR foi realizado em triplicado, utilizando RNA total obtido a partir de três culturas independentes. A transcrição reversa foi realizada a 50°C durante 30 minutos à qual se seguiu a activação da “HotStartTaq DNA

Polymerase” durante 15 minutos a 95°C. A amplificação do cDNA ocorreu em 35 ciclos com o seguinte perfil: desnaturação a 94°C durante 30 segundos, emparelhamento dos “primers” durante 30 segundos a 52°C e extensão durante 30 segundos a 72°C. A aquisição do sinal emitido, que ocorre devido à ligação do fluorocromo SYBR Green I às moléculas de DNA em cadeia dupla, é realizada após o passo de extensão a cada ciclo. A formação de produtos inespecíficos e dímeros de “primers” foi estudada através da análise das curvas de “melting” das reacções de qRT-PCR.

A determinação do nível relativo de expressão génica foi realizada através do método comparativo ou método da segunda derivada (Equação 1). A equação descreve a amplificação exponencial que ocorre durante a reacção de PCR onde o nível de expressão génica relativa é calculado com base nas eficiências das reacções e no desvio dos valores de C_q da amostra em estudo *versus* o gene de referência.

$$\text{Expressão relativa: } 2^{-(\Delta C_{q\text{amostra}} - \Delta C_{q\text{referência}})}$$

Equação 1. Equação utilizada na análise qualitativa da expressão génica no qRT-PCR (85). C_q : ciclo de quantificação de fluorescência; Δ : variação.

2.2.8 Processo de adaptação das estirpes H37Rv e 359/03 a concentrações constantes de isoniazida e rifampicina

O processo de adaptação das estirpes H37Rv e 359/03 aos antibacilares isoniazida e rifampicina foi conduzido no sistema BACTECTM MGITTM 960. A cultura primária foi obtida conforme o procedimento descrito no ponto 2.2.1.1. De seguida, deu-se início ao processo de adaptação das estirpes a uma concentração constante de rifampicina e isoniazida, realizada independentemente.

2.2.8.1 Processo de adaptação à rifampicina

A concentração de rifampicina a que as estirpes foram submetidas corresponde à concentração crítica utilizada nos testes de susceptibilidade, isto é, 1 µg/ml. Para o processo de adaptação propriamente dito, as culturas foram inoculadas em 7 ml de meio MGIT com 0,8 ml de suplemento SIRE, 0,1 ml de rifampicina a 83 µg/ml e 0,5 ml de cultura e incubadas a 37°C. Após terem alcançado os valores de GU necessários (entre 100 e 200 GU) as culturas foram retiradas do sistema. A passagem subsequente foi realizada com 0,5 ml da cultura anterior e assim sucessivamente (Figura 8). Os ensaios foram realizados em duplicado para cada estirpe e as culturas adaptadas resultantes foram designadas por um cardinal (#) seguido do respectivo número de passagem.

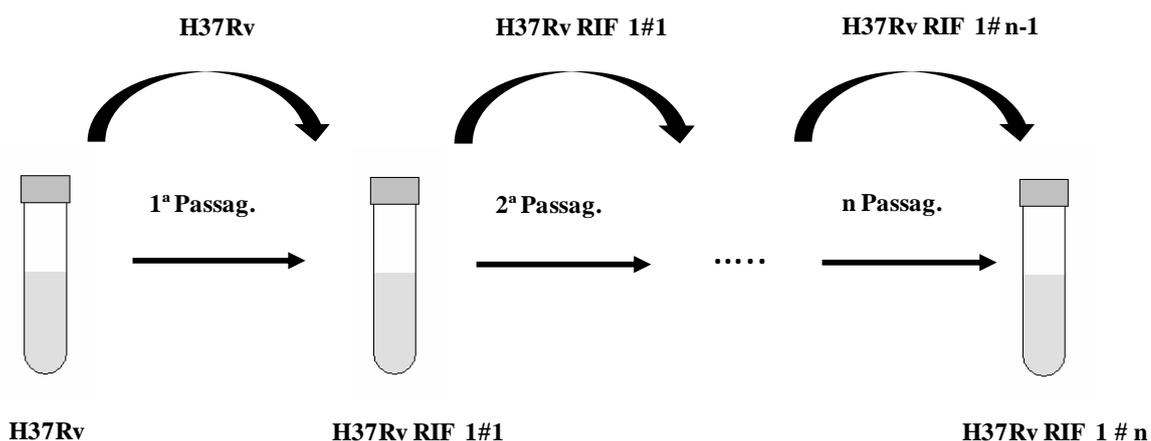


Figura 8. Representação esquemática do processo de adaptação à rifampicina. Exemplifica-se o processo de adaptação da estirpe H37Rv a 1 µg/ml de rifampicina em meio MGIT, com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960. RIF: rifampicina.

2.2.8.2 Processo de adaptação à isoniazida

A concentração de isoniazida a que as estirpes foram submetidas corresponde à concentração crítica utilizada nos testes de susceptibilidade, isto é, 0,1 µg/ml. Para o processo de adaptação procedeu-se do mesmo modo que para adaptação à rifampicina.

Assim, as culturas foram inoculadas em 7 ml de meio MGIT com 0,8 ml de suplemento SIRE, 0,1 ml de isoniazida a 8,3 µg/ml e 0,5 ml de cultura e incubadas a 37°C. Após terem alcançado os valores de GU necessários as culturas foram retiradas do sistema e efectuada a passagem subsequente (Figura 9). Novamente, os ensaios foram realizados em duplicado para cada estirpe e as culturas adaptadas resultantes foram designadas por um cardinal (#), seguido do respectivo número de passagem.

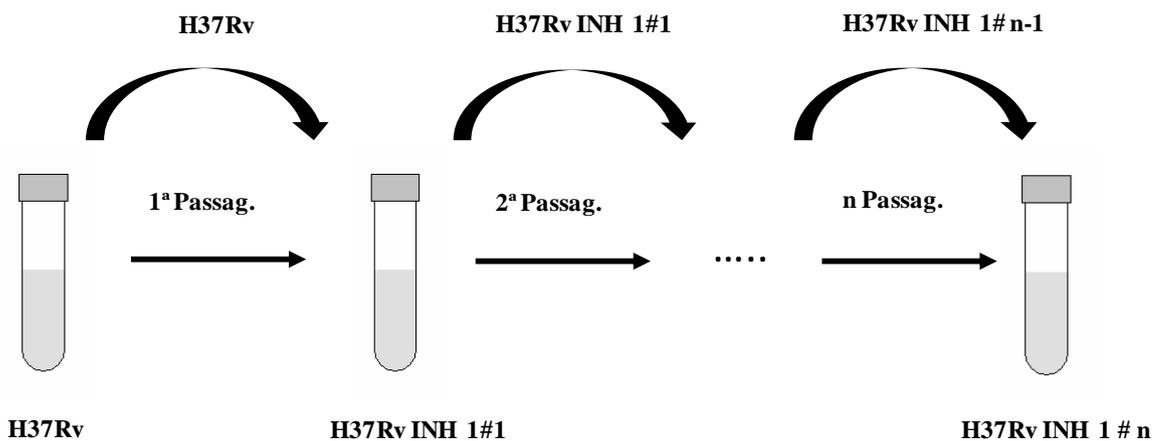


Figura 9. Representação esquemática do processo de adaptação à isoniazida. Exemplifica-se o processo de adaptação da estirpe H37Rv a 0,1 µg/ml de isoniazida em meio MGIT, com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960. INH: isoniazida.

2.2.9 Aplicação do “software” Epicenter/TB eXIST para o sistema BACTEC™ MGIT™ 960

A análise dos dados que resultaram do processo de crescimento, testes de susceptibilidade, adaptação das estirpes e determinação de CMIs realizada com sistema fluorimétrico BACTEC™ MGIT™ 960 foi efectuada com o “software” de gestão de dados Epicenter V5.53A equipado com o módulo TB eXIST.

O “software” Epicenter V5.53A e o módulo TB eXIST permitem a gravação automática de todas as leituras referentes às culturas realizadas, a extensão do tempo de incubação para além do tempo de positividade do controlo de crescimento, a representação gráfica

do aumento das unidades de crescimento em função do tempo para cada tubo, permitindo igualmente armazenar e tratar os dados obtidos.

Relativamente ao processo de crescimento das culturas primárias, este sistema permitiu obter uma curva de crescimento, tendo sido possível seguir o comportamento das estirpes em cultura. No final foram obtidas curvas de crescimento, nos quais os valores de GU são representados em função do tempo de incubação. A positividade do teste ocorre com valores de $GU \geq 75$.

Para a interpretação dos testes de susceptibilidade e determinação de CMIs, o princípio é semelhante ao estabelecido para a realização dos testes de susceptibilidade. No momento de positividade do controlo de crescimento proporcional, $GU = 400$, é feita a comparação com os tubos contendo as várias concentrações de antibiótico. As culturas dos tubos com antibiótico que apresentam valores de $GU \geq 100$ no momento de positividade do controlo proporcional de crescimento são interpretadas como resistentes; os tubos que apresentam valores de $GU < 100$ são incubados por um período adicional de 7 dias. Se ao fim dos 7 dias as culturas continuarem com valores de $GU < 100$ são interpretados como susceptíveis; se apresentarem valores de $GU \geq 100$ após os 7 dias de positividade do controlo proporcional são interpretados como possuindo resistência intermédia (159). É de referir também que o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 possui um controlo de crescimento para o complexo *M. tuberculosis*, não permitindo a interpretação de resultados com tempos de crescimento inferiores a 72 horas.

2.2.10 Determinação de taxas de mutação

As taxas de mutação das estirpes H37Rv e 359/03 em relação à isoniazida e rifampicina foram calculadas com base no trabalho de Luria e Delbruck e no protocolo desenvolvido por Hugo David (34,87). A determinação das taxas de mutação inicia-se com uma cultura em fase estacionária que irá ser posteriormente testada para selecção de mutantes e determinação do número células viáveis. O ensaio de flutuação é baseado

numa série de culturas paralelas, cada uma inoculada com um pequeno número de células (sem mutantes). A primeira mutação pode ocorrer bastante cedo em algumas das culturas ou muito tarde noutras, isto é, existe uma flutuação. No final do tempo necessário para o crescimento, o número de mutantes em cada cultura é determinado através do seu plaqueamento em meio selectivo e o número total de células viáveis é determinado por plaqueamento das culturas em meio não selectivo. Após o período de incubação, uma pequena fracção de células sobrevive como indicado pelo crescimento em meio selectivo e a taxa de mutação é então calculada a partir da distribuição do número de mutantes nas culturas (87).

O protocolo iniciou-se com culturas em fase estacionária (Figura 10), a partir das quais foram preparadas novas culturas por inoculação de 0,5 ml da cultura inicial em 200 ml de meio MB 7H9 suplementado com 10% OADC e 0,05% Tween 80 em erlenmeyers de 500 ml. Estas culturas designadas por culturas de elevada densidade foram incubadas a 37°C com 5-10% de CO₂ (CO₂ Water Jacketed Incubator, Nuaire Nu-4500/E), sem agitação.

O teste de flutuação foi realizado partir das culturas de elevada densidade a meio da fase exponencial (densidade óptica (D.O) a 600 nm, entre 0,6 e 0,8). As culturas de elevada densidade foram diluídas em meio MB 7H9, de modo a que 1 ml da diluição contivesse aproximadamente 10.000 células; desta diluição retirou-se 0,1 ml (cerca de 1.000 células) e inoculou-se um conjunto de culturas paralelas (designadas por culturas de baixa densidade) em tubos de ensaio com rosca com 5 ml de meio MB 7H9 suplementado com 10% OADC e 0,05% Tween 80. As culturas de baixa densidade foram de seguida incubadas a 37°C com 5-10% de CO₂ sem agitação até à saturação, sendo posteriormente diluídas para uma D.O de 0,8.

O cálculo do número de células viáveis presentes, nas culturas de elevada densidade no momento do teste, foi efectuado por diluição (factor 10⁰ a 10⁵) em meio MB 7H9 e por plaqueamento das células em placas de 90 mm contendo meio MB 7H11 com e sem antibiótico. Os plaqueamentos foram realizados em duplicado, utilizando-se 0,1 ml de

cada diluição. As placas foram seladas em sacos de plástico e incubadas a 37°C durante 3 semanas.

Para a selecção de mutantes, foram efectuadas diluições das culturas de baixa densidade por diluição (factor 10^0 a 10^6) em meio MB 7H9 e plaqueamento das mesmas em placas de 6 poços contendo meio MB 7H11 com as concentrações apropriadas dos antibióticos. A isoniazida foi testada, em ambas as estirpes, na concentração crítica baixa, (0,2 µg/ml), e na concentração crítica alta (1 µg/ml); a rifampicina foi testada, a 1 µg/ml, que corresponde à concentração crítica para a estirpe H37Rv (67) para a estirpe 359/03 a concentração utilizada corresponde ao valor da concentração mínima inibitória determinada para esta estirpe a este antibacilar. Os plaqueamentos foram realizados em duplicado, utilizando-se 0,1 ml de cada diluição. O volume de meio MB 7H11 utilizado para a preparação das placas foi de 5 ml. Para além disso, as culturas de baixa densidade foram plaqueadas em placas de 90 mm sem antibiótico, para determinação do número de células viáveis como descrito acima. As placas foram seladas em sacos de plástico e incubadas a 37°C durante 4 semanas.

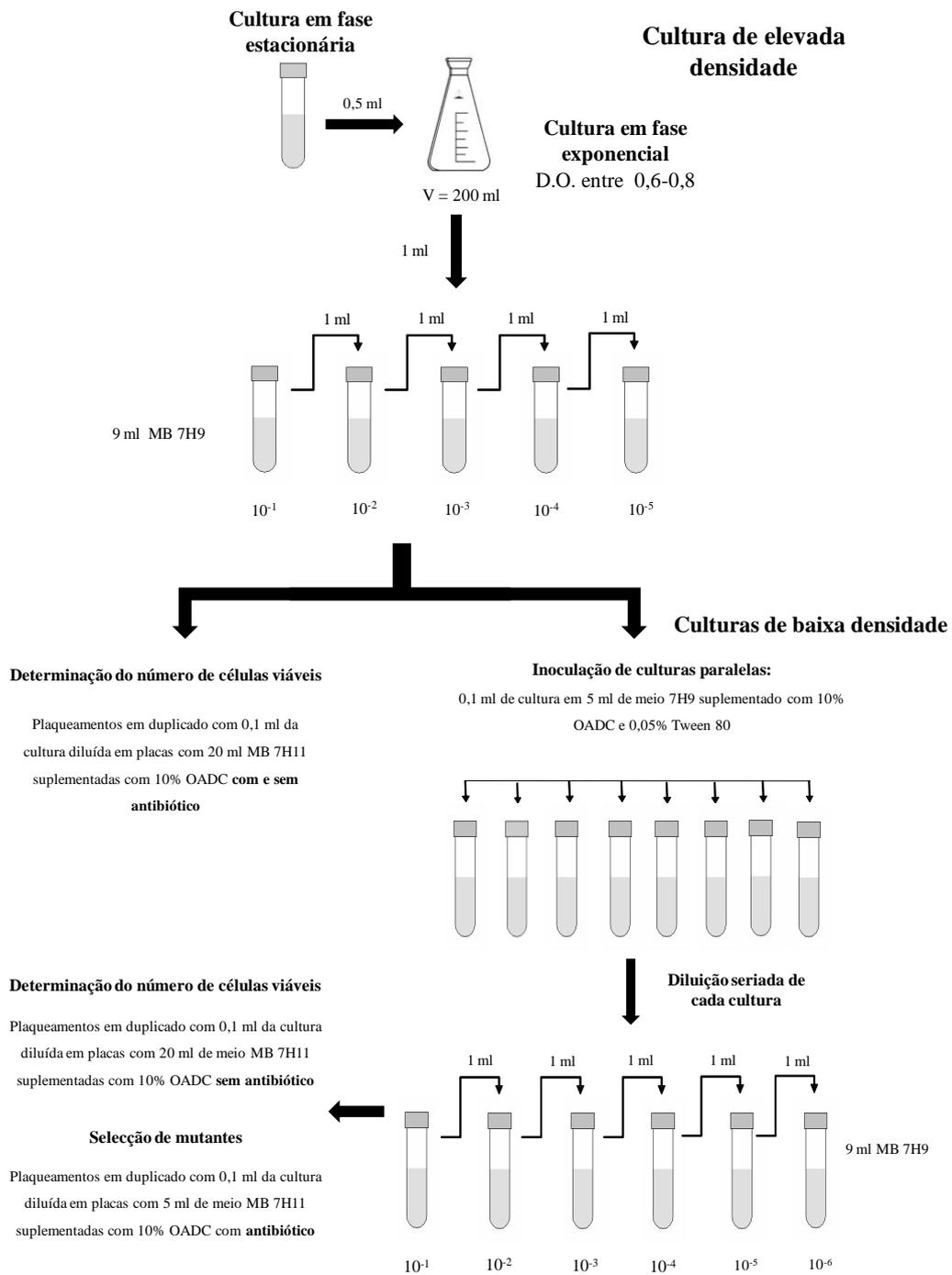


Figura 10. Representação esquemática do procedimento seguido para a determinação de taxas de mutação.

A frequência de mutação para cada estirpe foi determinada dividindo o valor médio do número de mutantes por mililitro pelo número total de células viáveis por mililitro. A taxa de mutação foi determinada através da seguinte equação:

$$r = a \cdot N_t \cdot \ln (N_t \cdot C \cdot a)$$

Equação 2. Equação utilizada para o cálculo das taxas de mutação (87). a: taxa de mutação; r: média do número de mutantes; N_t: número total de células no momento do teste; C: número de culturas testadas.

Para a determinação das taxas de mutação através da Equação 2 utilizou-se o “software” “Wolfram *Mathematica 7 for Students*” (Wolfram Research, Inc, 2009).

3.Resultados

3.1 Processo de adaptação aos antibacilares isoniazida e rifampicina

O processo de adaptação da estirpe de referência H37Rv (susceptível aos cinco antibacilares de primeira linha) e da estirpe clínica 359/03 (monorresistente à rifampicina), à isoniazida e rifampicina, foi conduzido aproximadamente durante seis meses. Este processo consistiu na exposição independente das duas estirpes à concentração crítica de ambos os antibacilares. Como referido anteriormente (Capítulo Materiais e Métodos; ponto 2.2.4.1), a concentração crítica é definida como a concentração necessária para eliminar cerca de 99% da população da estirpe controlo, H37Rv, que nunca esteve em contacto com o antibacilar. Considera-se que uma estirpe é susceptível a determinado antibacilar, testado na sua concentração crítica, quando a proporção de micobactérias resistentes presentes na cultura não excede 1%. As concentrações críticas são 0,1 µg/ml e 1 µg/ml, para a isoniazida e rifampicina, respectivamente (67).

Estabilidade dos antibacilares *in vitro*

O teste de susceptibilidade com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 é um teste qualitativo, que varia entre 4 a 12 dias para o teste de susceptibilidade SIRE. Assim, de modo a excluir a eventual ocorrência de crescimento micobacteriano, após a exposição à isoniazida ou rifampicina, devido à degradação destes antibacilares em cultura durante o tempo de exposição testado (até 30 dias), foi necessária a obtenção de informação sobre a estabilidade destes antibacilares em meio líquido. Conforme demonstrado por Siddiqi *et al.* (149) e Viveiros *et al.* (181) e a isoniazida mantêm-se estável *in vitro* (*i.e.* sem perda de actividade) após um período de cerca de 30 dias de incubação em meio líquido a 37°C. Relativamente à rifampicina, a sua actividade foi testada durante este trabalho, mostrando-se igualmente activa durante o período acima indicado.

3.1.1 Adaptação a 0,1 µg/ml de isoniazida

O processo de adaptação da estirpe H37Rv a uma concentração constante de isoniazida, correspondendo à concentração crítica de 0,1 µg/ml, mostra que, inicialmente, é necessário um longo período exposição a este antibacilar para que seja obtido crescimento. Estes resultados estão de acordo com outros estudos anteriormente realizados (149,181). No primeiro período de exposição, foram necessários cerca de 14-16 dias (média entre os dois ensaios) até ser obtido crescimento, período este que foi substancialmente reduzido nas passagens subsequentes, como demonstrado pela Figura 11. Após a terceira passagem em meio suplementado com isoniazida, o tempo necessário para a detecção de crescimento estabilizou entre os 3-4 dias. Por conveniência de designação das diferentes passagens a que as estirpes foram sujeitas, estas serão designadas por um cardinal (#), seguido do respectivo número de passagem.

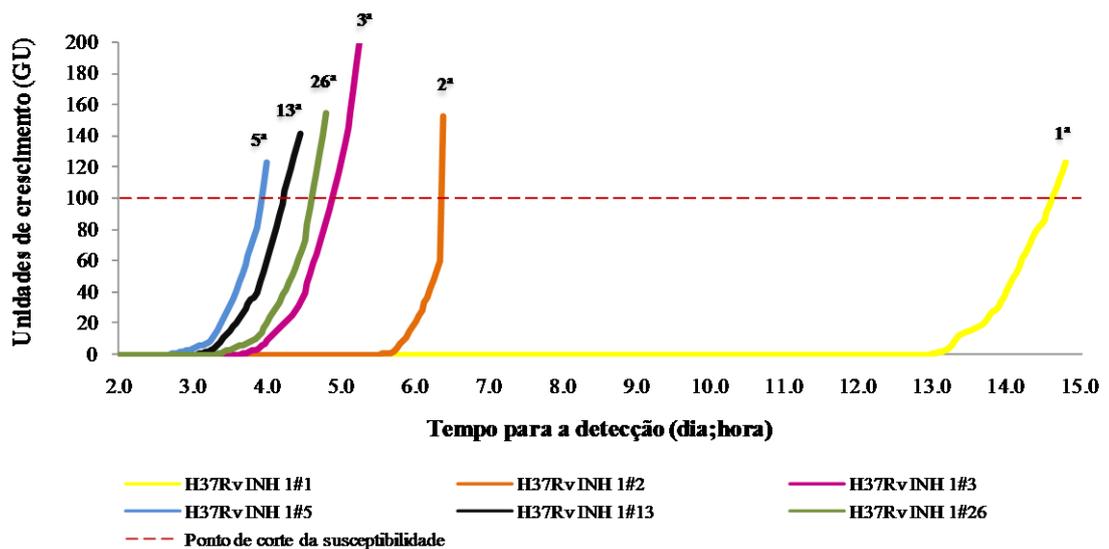


Figura 11. Evolução do processo de adaptação da estirpe H37Rv a uma concentração constante de INH (0,1 µg/ml). INH: isoniazida. Para esta estirpe, foram realizadas 26 passagens sucessivas em meio suplementado com isoniazida. Apenas estão representadas algumas das passagens realizadas, tendo estas sido seleccionadas de modo a ilustrar a evolução do processo de adaptação.

Durante o processo de adaptação da estirpe clínica 359/03 a 0,1 µg/ml de isoniazida, os resultados foram em parte, semelhantes aos resultados anteriormente obtidos para a

estirpe H37Rv. Inicialmente foi necessário um longo período de exposição a este antibacilar para que fosse detectado crescimento. No entanto, para esta estirpe, o processo de adaptação foi mais lento, sendo a adaptação à isoniazida gradual e não tão abrupta como verificado para a estirpe H37Rv. A estabilização do tempo necessário para a detecção de crescimento ocorreu apenas após a quarta passagem em meio suplementado com isoniazida. O primeiro período de exposição levou cerca de 18 dias (média entre os dois ensaios) até ser obtido crescimento, período este que foi gradualmente reduzido nas passagens subsequentes como demonstrado pela Figura 12. Após a quarta passagem em meio suplementado com isoniazida, o tempo necessário para a detecção de crescimento estabilizou entre os 4-5 dias.

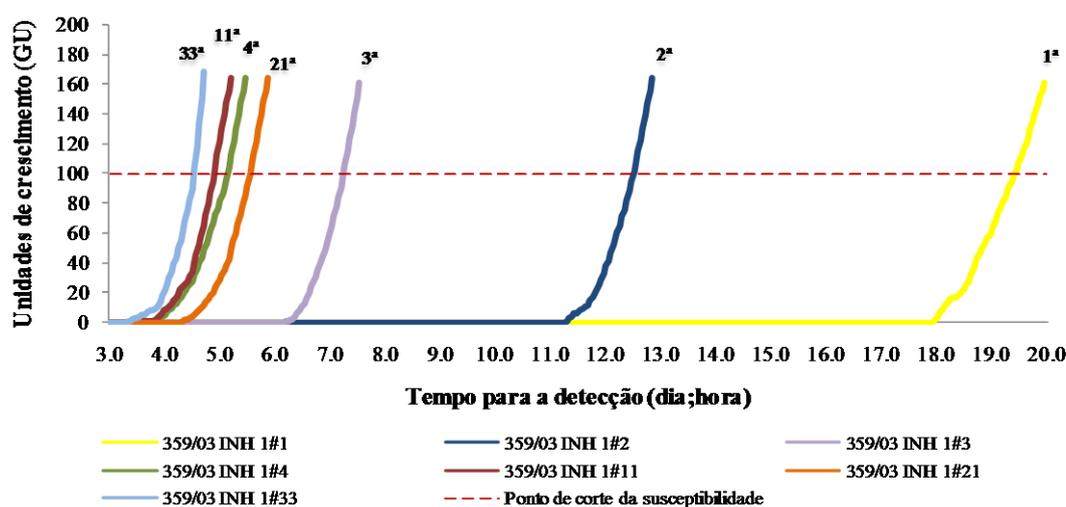


Figura 12. Evolução do processo de adaptação da estirpe 359/03 a uma concentração constante de INH (0,1 µg/ml). INH: isoniazida. Para esta estirpe, foram realizadas 33 passagens sucessivas em meio suplementado com isoniazida. Apenas estão representadas algumas das passagens realizadas, tendo estas sido seleccionadas de modo a ilustrar a evolução do processo de adaptação.

3.1.2 Adaptação a 1 µg/ml de rifampicina

O processo de adaptação da estirpe de referência H37Rv mostra que quando esta estirpe é exposta a uma concentração constante de rifampicina, correspondendo à concentração

crítica de 1 µg/ml, esta demora cerca de 30 dias (média entre os dois ensaios) até ser obtido crescimento detectável pelo sistema. Este período mantém-se mais ou menos estável nas duas passagens subsequentes, no entanto, após a terceira passagem aumenta substancialmente, como se pode observar na Figura 13.

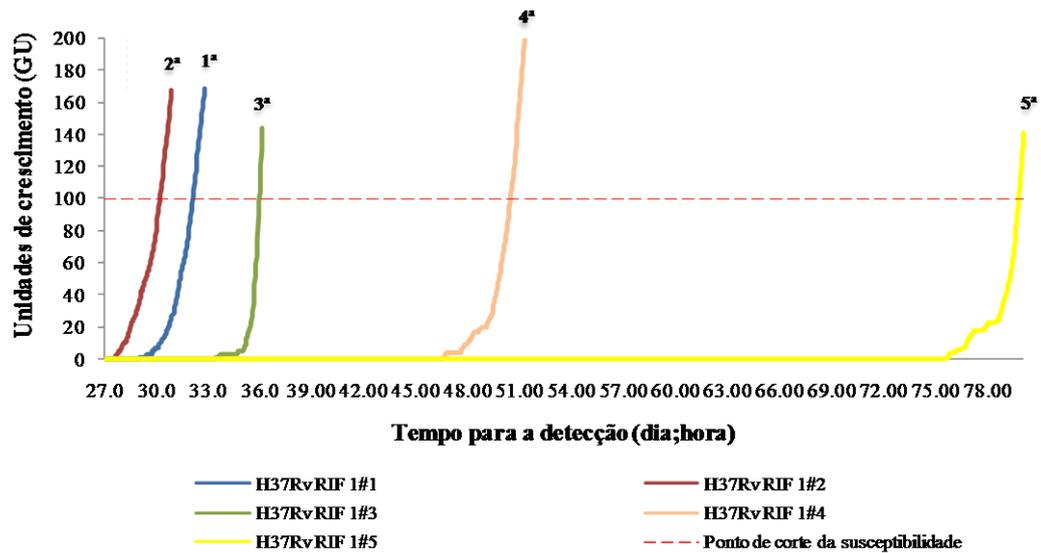


Figura 13. Evolução do processo de adaptação da estirpe H37Rv a uma concentração constante de RIF (1 µg/ml). RIF: rifampicina. Para esta estirpe, foram realizadas 5 passagens sucessivas em meio suplementado com rifampicina.

Comparativamente, a estirpe clínica 359/03, quando exposta a 1 µg/ml de rifampicina, cresce rapidamente (Figura 14) tal como esperado, uma vez que possui uma mutação no gene *rpoB*, que lhe confere resistência a este antibacilar.

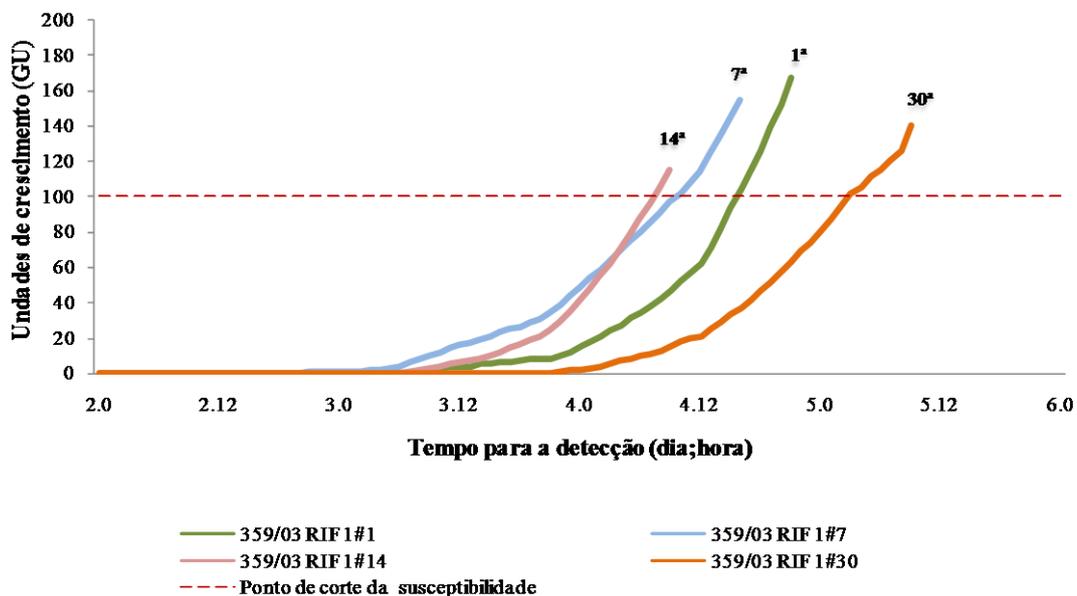


Figura 14. Evolução do processo de adaptação da estirpe 359/03 a uma concentração constante de RIF (1 µg/ml). RIF: rifampicina. Para esta estirpe, foram realizadas 30 passagens sucessivas em meio suplementado com rifampicina. Apenas estão representadas algumas das passagens realizadas, tendo estas sido seleccionadas de modo a ilustrar a evolução do processo de adaptação.

3.2 Caracterização fenotípica das estirpes H37Rv e 359/03, originais e adaptadas

A caracterização fenotípica das estirpes originais e adaptadas foi efectuada através da determinação das concentrações mínimas inibitórias para a isoniazida e rifampicina, da realização do teste de susceptibilidade aos cinco antibacilares de primeira linha e determinação da actividade da catalase.

3.2.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI)

A determinação das CMIs foi realizada antes, durante e no final do processo de adaptação aos antibacilares. Deste modo, foi possível avaliar, periodicamente, o grau de susceptibilidade para os dois antibacilares em estudo, isoniazida e rifampicina, tendo como parâmetro de comparação, as CMIs das estirpes originais.

Como referido anteriormente, a determinação das CMIs foi realizada tendo como base o princípio subjacente aos testes de susceptibilidade aos antibacilares, *i.e.* o método das proporções. A resistência é estabelecida quando o número de bactérias resistentes ao fármaco testado for superior a 1%, quando comparado com o tubo controlo ao qual não foi adicionado o fármaco. Este método consiste na comparação da taxa de crescimento de um tubo MGIT sem antibiótico e inoculado com uma diluição 1/100 (controlo proporcional de crescimento) da mesma suspensão da amostra que é inoculada nos tubos com antibiótico na concentração crítica. Isto permite saber se nos tubos inoculados com antibiótico, onde a proporção bacilar é 100 vezes superior à do tubo controlo, existe uma percentagem superior ou igual a 1% de bacilos resistentes (Capítulo Materiais e Métodos, pontos 2.2.4.1 e 2.2.4.3). Para este protocolo, foi introduzido um novo parâmetro, o controlo absoluto. A validação do ensaio (determinação das concentrações mínimas inibitórias) é realizada por comparação entre os tempos de crescimento dos controlos absoluto e proporcional (Capítulo Materiais e Métodos, ponto 2.2.4.3.1).

A determinação das CMIs foi efectuada com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960, encontrando-se os resultados resumidos nas Tabelas 17 a 23. Na Figura 15 exemplifica-se o critério utilizado para a interpretação destes gráficos e determinação de CMIs com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 (Epicenter/TB-eXIST).

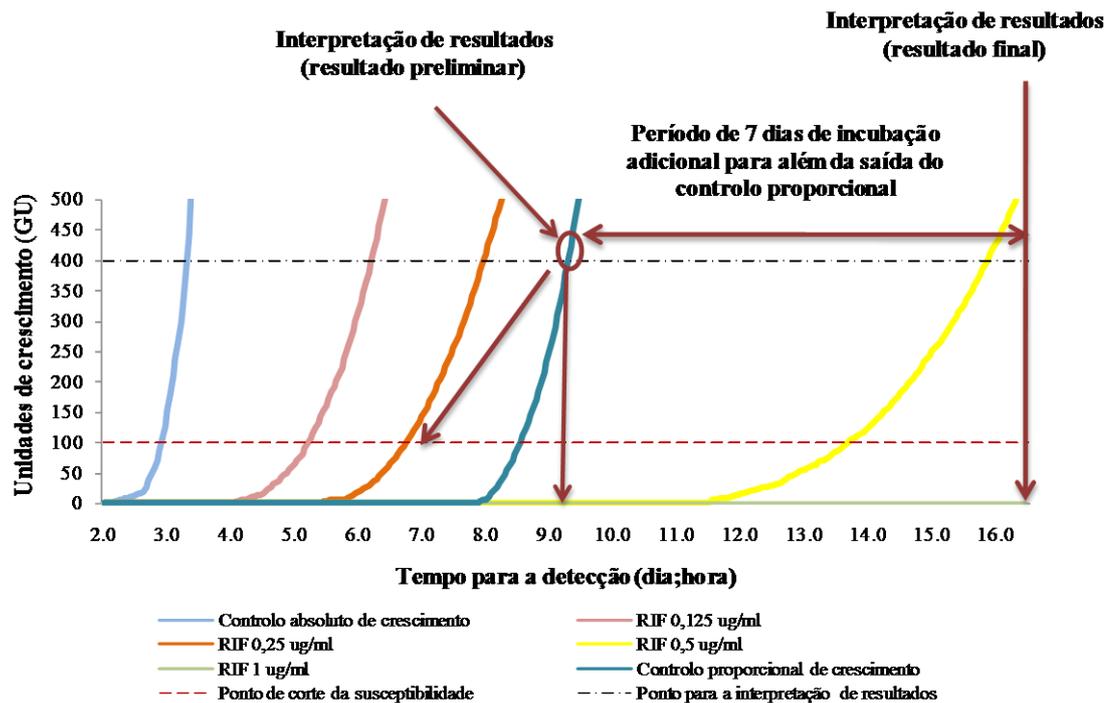


Figura 15. Ilustração do critério utilizado para interpretação de resultados na determinação de CMI realizada pelo sistema BACTEC™ MGIT™ 960 e o “software” Epicenter/TB-eXIST. No momento de positividade do controlo proporcional de crescimento, $GU = 400$, é feita a comparação com os tubos contendo as várias concentrações de antibiótico. As culturas dos tubos com antibiótico que apresentam valores de $GU \geq 100$ no momento de positividade do controlo proporcional de crescimento são interpretadas como resistentes; os tubos que apresentam valores de $GU < 100$ são incubados por um período adicional de 7 dias. Se ao fim dos 7 dias as culturas continuarem com valores de $GU < 100$ são consideradas susceptíveis; se apresentarem valores de $GU \geq 100$ após os 7 dias de positividade do controlo proporcional de crescimento, são interpretadas como possuindo nível de resistência intermédia (159). No exemplo aqui ilustrado, a cultura seria classificada como sendo resistente a 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina, apresentando um nível de resistência intermédia a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e susceptível a 1 $\mu\text{g/ml}$ (coincide com o eixo das abcissas, por ausência de crescimento).

A “performance” do sistema BACTEC™ MGIT™ 960 para a determinação de CMIs em *M. tuberculosis* foi comparada com a realização das mesmas no sistema BACTEC™ 460-TB. Os gráficos obtidos com o “software” Epicenter/TB-eXIST, referentes à determinação das CMIs foram interpretados de acordo com o descrito no ponto 2.2.9 do Capítulo Materiais e Métodos. Os resultados obtidos foram concordantes entre os dois

sistemas, excepto quando se verifica resistência intermédia, que é detectada pelo sistema BACTEC™ MGIT™ 960, como anteriormente explicado, mas que não é detectável na maioria dos casos, pelo sistema BACTEC™ 460-TB.

3.2.1.1 Evolução do processo de adaptação da estirpe H37Rv

Adaptação à isoniazida

A estirpe H37Rv original apresenta um nível de resistência intermédia para a isoniazida a 0,05 µg/ml e um nível de resistência intermédio a 0,5 µg/ml para a rifampicina. A estirpe adaptada à isoniazida, H37Rv INH 1#1, apresenta um nível de resistência 2560 vezes superior à da estirpe que lhe deu origem. Em relação à rifampicina, o valor de CMI mantém-se igual ao da estirpe original. Estes níveis de resistência permanecem inalteráveis nas estirpes H37Rv INH 1#2, #3, #5, #13 e #26 (Tabelas 17 e 18; Figura 16). Por conveniência são apresentados os valores de resistência intermédia (concentração de antibiótico que permitiu crescimento nos 7 dias seguintes à positividade do controlo proporcional) e de resistência final (culturas na presença de antibiótico cuja concentração não permitiu crescimento nos 7 dias seguintes à positividade do controlo proporcional).

De notar que a CMI para cada estirpe é definida pela concentração mais baixa de antibiótico que não permitiu crescimento superior a 100 GU nos 7 dias subsequentes à positividade do controlo proporcional. Para este trabalho é conveniente utilizar e referenciar as culturas com resistência intermédia, pois são fonte de material para o processo de adaptação e para as análises fenotípica e genotípica.

Tabela 17. Valores de CMI para a isoniazida referentes às culturas H37Rv adaptadas à isoniazida. A vermelho assinala-se a variação do nível de susceptibilidade das culturas, em relação à estirpe original.

Culturas	Antibacilar	Nível de susceptibilidade (µg/ml)	CMI (µg/ml)
H37Rv	INH	Resistência intermédia a 0,05	0,1
H37Rv INH 1#1	INH	Resistência intermédia a 128	256
H37Rv INH 1#2	INH	Resistência intermédia a 128	256
H37Rv INH 1#3	INH	Resistência intermédia a 128	256
H37Rv INH 1#5	INH	Resistência intermédia a 128	256
H37Rv INH 1#13	INH	Resistência intermédia a 128	256
H37Rv INH 1#26	INH	Resistência intermédia a 128	256

CMI: concentração mínima inibitória; INH; isoniazida.

Tabela 18. Valores de CMI para a rifampicina referentes às culturas H37Rv adaptadas à isoniazida.

Culturas	Antibacilar	Nível de susceptibilidade (µg/ml)	CMI (µg/ml)
H37Rv	RIF	Resistência intermédia a 0,5	1
H37Rv INH 1#1	RIF	Resistência intermédia a 0,5	1
H37Rv INH 1#2	RIF	Resistência intermédia a 0,5	1
H37Rv INH 1#3	RIF	Resistência intermédia a 0,5	1
H37Rv INH 1#5	RIF	Resistência intermédia a 0,5	1
H37Rv INH 1#13	RIF	Resistência intermédia a 0,5	1
H37Rv INH 1#26	RIF	Resistência intermédia a 0,5	1

CMI: concentração mínima inibitória; INH; isoniazida; RIF: rifampicina.

Adaptação à rifampicina

No processo de adaptação da estirpe H37Rv à rifampicina, o cenário apresenta-se ligeiramente diferente do verificado na adaptação à isoniazida. Ao fim de cinco passagens em meio suplementado com rifampicina verifica-se uma redução nos valores de CMI, quer para a rifampicina quer para a isoniazida, por um factor de dois (Tabela 19; Figura 16). Esta variação é considerada pouco significativa por se encontrar dentro

da variação expectável, em termos de execução técnica da determinação de concentrações mínimas inibitórias.

Durante o processo de adaptação da estirpe H37Rv à rifampicina, verificaram-se ainda alterações ao nível da morfologia dos bacilos, que perderam a sua forma habitual de bastonetes, tornando-se mais cocóides. Notaram-se também alterações ao nível da disposição espacial das células, perdendo o seu característico aglomerado “em corda”, passando a uma disposição mais compacta.

Tabela 19. Valores de CMI para a isoniazida e rifampicina referentes à cultura H37Rv adaptada à rifampicina. A vermelho assinala-se a variação do nível de susceptibilidade das estirpes, em relação à estirpe original.

Culturas	Antibacilar	Nível de susceptibilidade (µg/ml)	CMI (µg/ml)
H37Rv	RIF	Resistência intermédia a 0,5	1
	INH	Resistência intermédia a 0,05	0,1
H37Rv RIF 1#5	RIF	Resistência intermédia a 0,25	0,5
	INH	Resistência intermédia a 0,025	0,05

CMI: concentração mínima inibitória; INH; isoniazida; RIF: rifampicina.

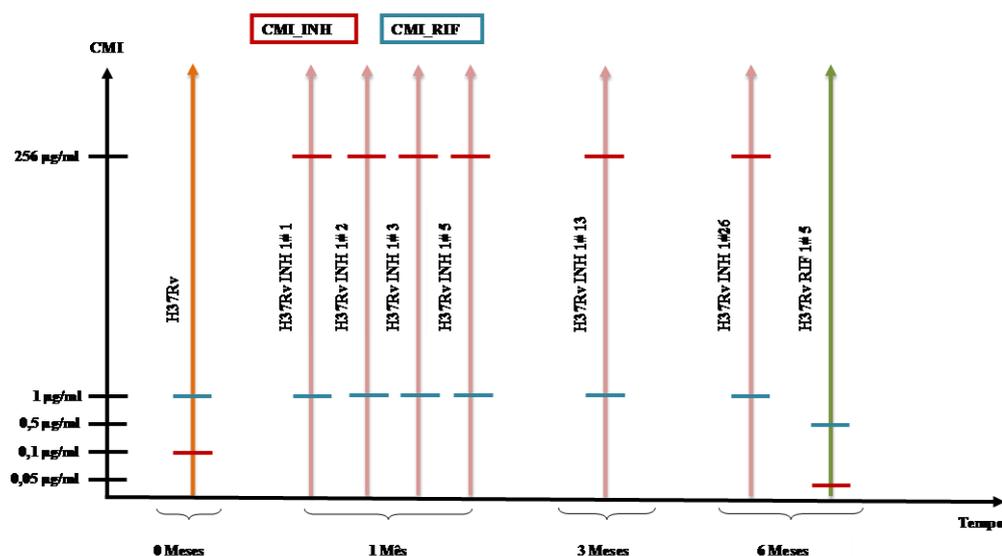


Figura 16. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas H37Rv resultantes da adaptação a 0,1 µg/ml de isoniazida (barras rosa) e a 1 µg/ml de rifampicina (barra verde). A barra laranja corresponde à estirpe original H37Rv. CMI: concentração mínima inibitória; INH: isoniazida; RIF: rifampicina.

3.2.1.2 Evolução do processo de adaptação da estirpe 359/03

Adaptação à isoniazida

A estirpe 359/03 original apresenta um valor de CMI para a isoniazida de 0,05 µg/ml. A cultura adaptada à isoniazida, 359/03 INH 1#1, apresenta um valor de CMI para a isoniazida inferior a 1 µg/ml. O valor de CMI relativamente à isoniazida na cultura adaptada 359/03 INH 1#5 aumenta para 256 µg/ml e mantém-se inalterada nas culturas 359/03 INH 1#11 e #33 (Tabela 20 e Figura 17). Para a rifampicina, o valor de CMI inicial é de 256 µg/ml, valor este que se mantém inalterado na cultura 359/03 INH 1#1. Na cultura 359/03 INH 1#5, #11 e #33, o nível de resistência diminui, em relação à estirpe original, para 128 µg/ml (Tabela 21 e Figura 17), variação esta considerada pouco significativa, por se encontrar dentro da variação expectável, em termos de execução técnica da determinação de concentrações mínimas inibitórias.

Tabela 20. Valores de CMI para a isoniazida das culturas 359/03 adaptadas à isoniazida.

A vermelho assinala-se a variação do nível de susceptibilidade das culturas, em relação à estirpe original.

Culturas	Antibacilar	Nível de susceptibilidade (µg/ml)	CMI (µg/ml)
359/03	INH	Susceptível a 0,05	0,05
359/03 INH 1#1	INH	Susceptível a 1	1
359/03 INH 1#5	INH	Resistência intermédia a 128	256
359/03 INH 1#11	INH	Resistência intermédia a 128	256
359/03 INH 1#33	INH	Resistência intermédia a 128	256

CMI: concentração mínima inibitória; INH; isoniazida.

Tabela 21. Valores de CMI para a rifampicina das culturas 359/03 adaptadas à isoniazida.

A vermelho encontra-se a aumento do nível de susceptibilidade da estirpe original.

Culturas	Antibacilar	Nível de susceptibilidade (µg/ml)	CMI (µg/ml)
359/03	RIF	Susceptível a 256	256
359/03 INH 1#1	RIF	Susceptível a 256	256
359/03 INH 1#5	RIF	Resistência intermédia a 128	256
359/03 INH 1#11	RIF	Resistência intermédia a 128	256
359/03 INH 1#33	RIF	Resistência intermédia a 128	256

CMI: concentração mínima inibitória; INH; isoniazida; RIF: rifampicina.

Adaptação à rifampicina

Quando adaptadas à rifampicina, as culturas 359/03 RIF 1#7 e #14 apresentam resistência intermédia a 256 µg/ml de rifampicina mas na cultura 359/03 RIF 1#30, esta resistência diminui para 128 µg/ml (Tabela 22 e Figura 18). Estas culturas apresentam uma ligeira subida do nível de resistência para a isoniazida, passando de susceptíveis a

0,05 µg/ml para um nível de resistência intermédia à mesma concentração (Tabela 23 e Figura 18).

Tabela 22. Valores de CMI para a rifampicina das culturas 359/03 adaptadas à rifampicina. A vermelho assinala-se a variação do nível de susceptibilidade das culturas, em relação à estirpe original.

Culturas	Antibacilar	Nível de susceptibilidade (µg/ml)	CMI (µg/ml)
359/03	RIF	Susceptível a 256	256
359/03 RIF 1#7	RIF	Resistência intermédia a 256	512
359/03 RIF 1#14	RIF	Resistência intermédia a 256	512
359/03 RIF 1#30	RIF	Resistência intermédia a 128	256

CMI: concentração mínima inibitória; RIF: rifampicina.

Tabela 23. Valores de CMI para a isoniazida das culturas 359/03 adaptadas à rifampicina. A vermelho encontra-se a variação do nível de resistência das culturas, em relação à estirpe original.

Culturas	Antibacilar	Nível de susceptibilidade (µg/ml)	CMI (µg/ml)
359/03	INH	Susceptível a 0,05	0,05
359/03 RIF 1#7	INH	Resistência intermédia a 0,05	0,1
359/03 RIF 1#14	INH	Resistência intermédia a 0,05	0,1
359/03 RIF 1#30	INH	Resistência intermédia a 0,05	0,1

CMI: concentração mínima inibitória; INH; isoniazida; RIF: rifampicina.

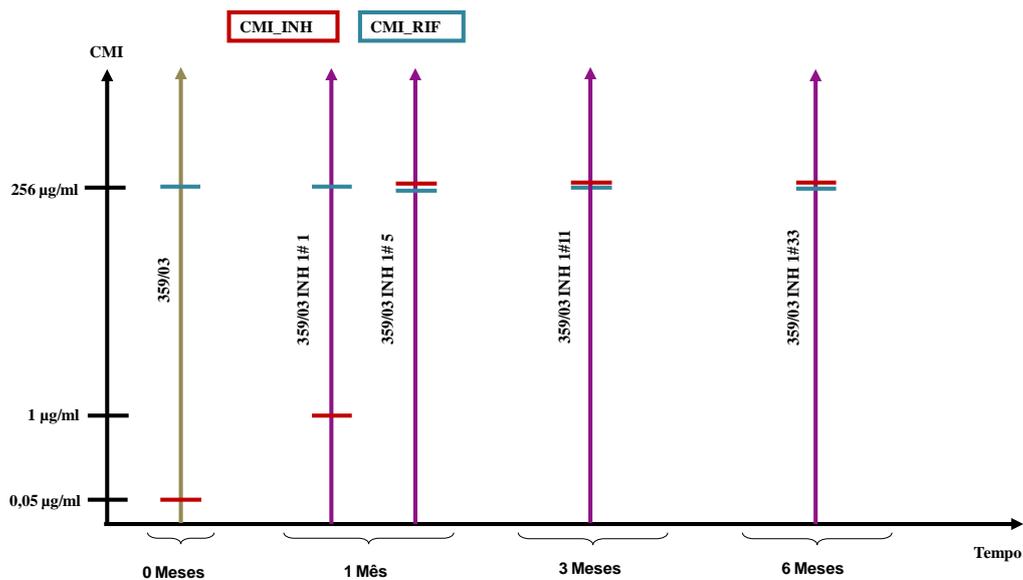


Figura 17. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas 359/03 resultantes da adaptação a 0,1 µg/ml de isoniazida (barras lilás). A barra bege corresponde à estirpe original 359/03. CMI: concentração mínima inibitória; INH: isoniazida; RIF: rifampicina.

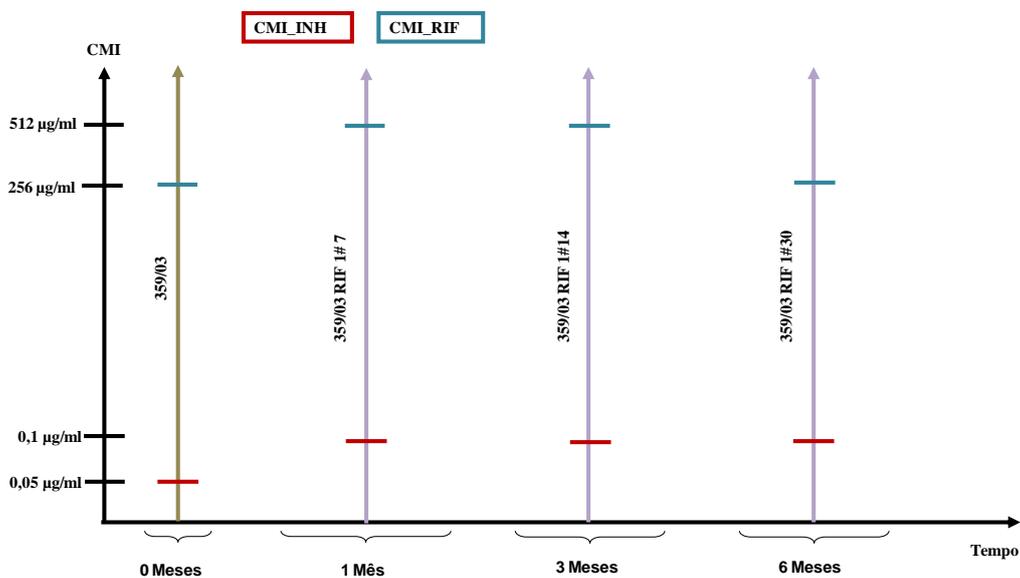


Figura 18. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas 359/03 resultantes da adaptação a 1 µg/ml de rifampicina (barras violeta). A barra bege corresponde à estirpe original 359/03. CMI: concentração mínima inibitória; INH: isoniazida; RIF: rifampicina.

3.2.2 Teste de susceptibilidade aos antibacilares

O teste de susceptibilidade aos cinco antibacilares de primeira linha, estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida, foi efectuado no início e no final do processo de adaptação (Tabela 24).

Tabela 24. Teste de susceptibilidade aos cinco antibacilares de primeira linha das culturas originais e adaptadas à isoniazida e rifampicina.

Cultura	Teste de susceptibilidade aos antibacilares
H37Rv	Susceptível aos 5 antibacilares de primeira linha
H37Rv INH 1#26	Susceptível à STR, RIF, EMB e PZA; resistente à INH
H37Rv RIF 1#5	Susceptível aos 5 antibacilares de primeira linha
359/03	Susceptível à STR, INH, EMB e PZA; resistente à RIF
359/03 INH 1#33	Susceptível à STR, EMB e PZA; resistente à RIF e INH
359/03 RIF 1#30	Susceptível à STR, INH, EMB e PZA; resistente à RIF

STR: estreptomicina; INH; isoniazida; RIF: rifampicina; EMB: etambutol; PZA: pirazinamida.

3.2.3 Teste de tolerância ao calor para a detecção da actividade da catalase nas estirpes em estudo

Dada a estreita relação que existe entre a resistência à isoniazida e a actividade da catalase, neste trabalho foi realizado o teste de tolerância ao calor. Este teste baseia-se na termolabilidade da catalase de *M. tuberculosis* e estuda a actividade catalásica à temperatura ambiente e a 68°C (35). O teste foi aplicado a todas as culturas em estudo ou até as culturas se tornarem negativas no ensaio à temperatura ambiente. Os resultados estão resumidos na Tabela 25.

Tabela 25. Análise da actividade da catalase das estirpes em estudo.

	Actividade da catalase	
	Temperatura ambiente	68°C
H37Rv	Catalase positiva	Catalase negativa
H37Rv INH 1#1	Catalase positiva (reduzida)	Catalase negativa
H37Rv INH 1#2	Catalase positiva (reduzida)	Catalase negativa
H37Rv INH 1#3	Catalase negativa	Catalase negativa
H37Rv INH 1#5	Catalase negativa	Catalase negativa
H37Rv RIF 1#5	Catalase positiva	Catalase negativa
359/03	Catalase positiva	Catalase negativa
359/03 INH 1#1	Catalase positiva	Catalase negativa
359/03 INH 1#5	Catalase positiva (reduzida)	Catalase negativa
359/03 INH 1#11	Catalase positiva (reduzida)	Catalase negativa
359/03 INH 1#33	Catalase positiva (reduzida)	Catalase negativa
359/03 RIF 1#1	Catalase positiva	Catalase negativa
359/03 RIF 1#7	Catalase positiva	Catalase negativa
359/03 RIF 1#30	Catalase positiva	Catalase negativa

Como esperado, ambas as estirpes H37Rv e 359/03 produzem catalase à temperatura ambiente mas não a 68°C. Em relação às culturas adaptadas, verifica-se que durante o processo de adaptação à isoniazida, a estirpe H37Rv perde a capacidade de produzir catalase à temperatura ambiente, enquanto para a estirpe 359/03, se verifica uma redução, mas não perda total, desta capacidade. Em relação à rifampicina, não se verificam alterações na produção de catalase ao longo do processo, quer para H37Rv, quer para 359/03.

3.3 Caracterização genotípica das estirpes H37Rv e 359/03, originais e adaptadas

A caracterização genotípica das estirpes H37Rv e 359/03 foi efectuada, inicialmente pela confirmação da identificação através do método *Accuprobe*, uma vez que é o método de referência para a identificação de elementos complexo *M. tuberculosis*. De seguida, ambas as estirpes foram identificadas ao nível da espécie através de PCR e hibridação reversa com o sistema de identificação Genotype MTBC.

A pesquisa de mutações associadas à resistência aos dois antibacilares em estudo, rifampicina e isoniazida, foi realizada por PCR e hibridação reversa através dos sistemas INNOLiPA Rif. TB e Genotype MTBDR*plus*. O resultado da caracterização genotípica das culturas originais e adaptadas encontra-se exposto nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 26. Caracterização genotípica das culturas H37Rv, original e adaptadas à isoniazida e à rifampicina.

Cultura	Accuprobe	Genotype MTBC	INNOLiPA Rif. TB	Genotype MTBDR_{plus}
H37Rv	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> WT	MTBC <i>rpoB</i> WT <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT
H37Rv INH 1#1	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> WT	MTBC <i>rpoB</i> WT <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT
H37Rv INH 1#2	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> WT	MTBC <i>rpoB</i> WT <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT
H37Rv INH 1#3	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> WT	MTBC <i>rpoB</i> WT Δ <i>katG</i> ; <i>inhA</i> WT
H37Rv INH 1#5	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> WT	MTBC <i>rpoB</i> WT Δ <i>katG</i> ; <i>inhA</i> WT
H37Rv INH 1#13	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> WT	MTBC <i>rpoB</i> WT Δ <i>katG</i> ; <i>inhA</i> WT
H37Rv INH 1#26	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> WT	MTBC <i>rpoB</i> WT Δ <i>katG</i> ; <i>inhA</i> WT
H37Rv RIF 1#5	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> WT	MTBC <i>rpoB</i> WT <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT

MTBC: *M. tuberculosis* complex; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; WT: “wild type”; Δ: ocorrência de uma deleção no gene *katG*.

Tabela 27. Caracterização genotípica das culturas 359/03, original e adaptadas à isoniazida e à rifampicina.

Cultura	Accuprobe	Genotype MTBC	INNOLiPA Rif. TB	Genotype MTBDR_{plus}
359/03	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT
359/03 INH 1#1	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT
359/03 INH 1#5	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT
359/03 INH 1#11	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT
359/03 INH 1#33	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT
359/03 RIF 1#1	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT
359/03 RIF 1#7	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT
359/03 RIF 1#30	MTBC	<i>M. tuberculosis</i>	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L	MTBC <i>rpoB</i> : mutação S531L <i>katG</i> WT; <i>inhA</i> WT

MTBC: *M. tuberculosis* complex; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; WT: “wild type”.

Da análise dos dados apresentados nas Tabelas 26 e 27, verifica-se que nas culturas adaptadas à rifampicina não ocorreram alterações nos alvos responsáveis pela resistência aos antibióticos em estudo, *rpoB*, *katG* e *inhA*, abrangidos pelos métodos de detecção utilizados. Relativamente ao processo de adaptação à isoniazida para a estirpe H37Rv verificou-se a ocorrência de uma deleção no gene *katG* na cultura H37Rv INH 1#3 (CMI de 256 µg/ml) que se mantém nas passagens seguintes. De facto foi possível observar que não ocorre hibridação do produto de PCR testado com nenhuma das sondas respeitantes ao gene *katG*, e que, inclusive, não existe sinal de hibridação com a sonda referente ao controlo do gene *katG* (Figura 19). Contrariamente, durante o processo de adaptação à isoniazida na estirpe 359/03, verificou-se que esta estirpe não sofreu nenhuma das mutações nos genes que conferem resistência à isoniazida abrangidas pelos testes efectuados, apesar do elevado grau de resistência apresentado ao fim de 33 passagens em meio suplementado com isoniazida a 0,1 µg/ml.

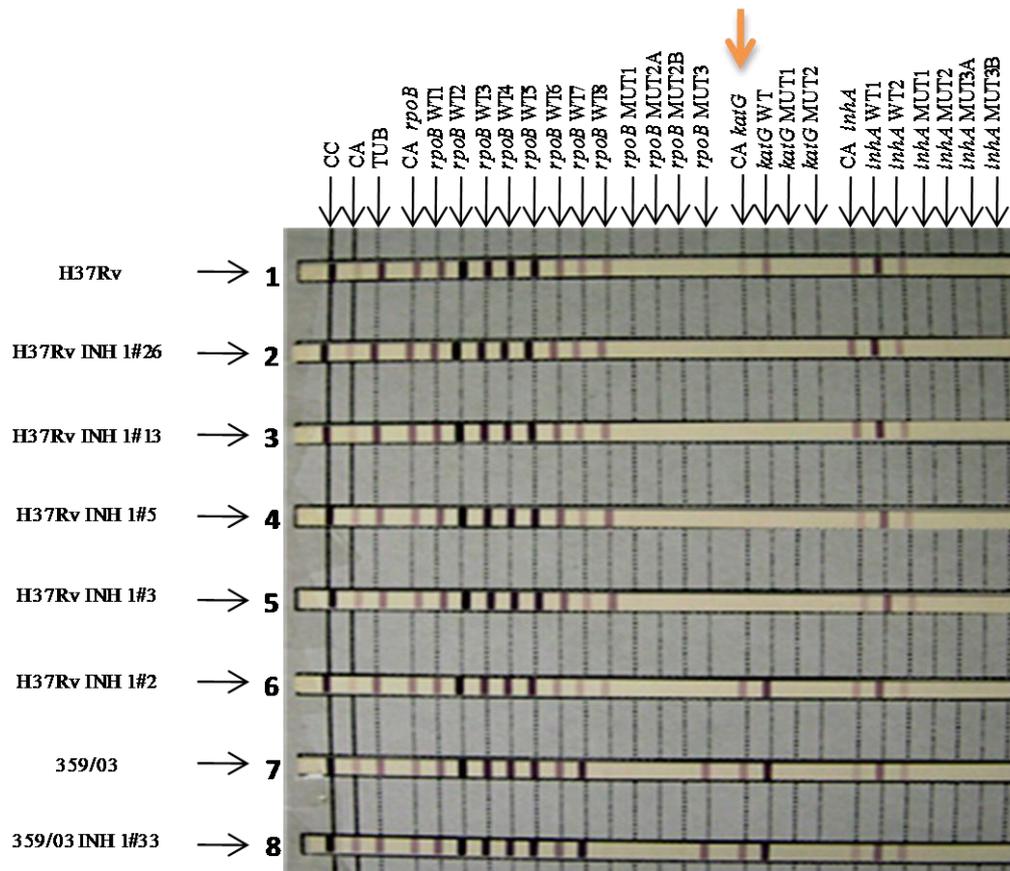


Figura 19. Pesquisa de mutações em genes envolvidos na resistência à rifampicina e isoniazida utilizando o sistema Genotype MTBDR*plus*. CC: controle do conjugado; CA: controle de amplificação (23S RNA); TUB: sonda para o complexo *M. tuberculosis*; CA *rpoB*: controle de amplificação do gene *rpoB*; CA *katG*: controle de amplificação do gene *katG*; CA *inhA*: controle de amplificação do gene *inhA*. As sondas “wild type” e de mutação referentes aos três genes estão descritas nas Tabelas 14 a 16 do capítulo Materiais e Métodos. A seta indica a sonda referente ao controle do gene *katG*.

De modo a confirmar os resultados obtidos com o sistema GenoType MTBDR*plus* em relação ao gene *katG*, foi desenhado um conjunto de “primers”, *katG*_Fw e *katG*_Rv, que amplificam uma zona de 803 pb, compreendida entre os nucleótidos 2548 e 3351 do gene *katG* (Tabela 3; Capítulo Materiais e Métodos). Esta região abrange toda a área coberta pelo sistema Genotype MTBDR*plus* relativamente às sondas WT e de mutação do gene *katG*. Assim, verificou-se que nas culturas H37Rv INH 1#1 e #2 existe amplificação deste fragmento, enquanto nas culturas #3, #11 e #26 não ocorre

amplificação (Figura 20). Estes dados confirmam os resultados obtidos com o sistema de detecção MTBDR_{plus}.

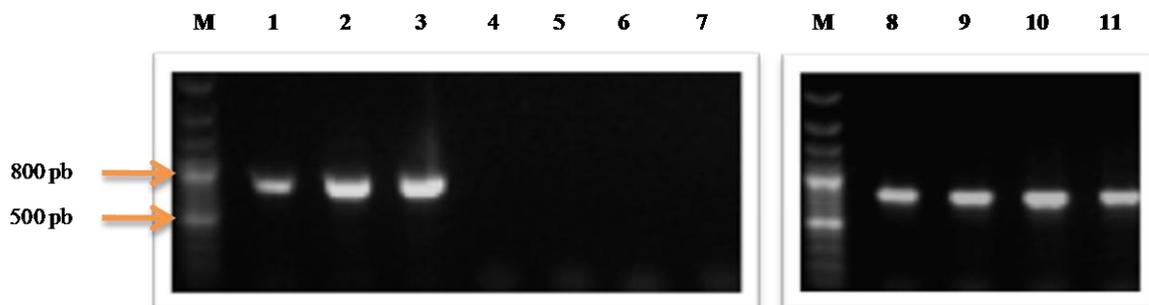


Figura 20. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de parte do gene *katG* por PCR, utilizando os “primers” *katG_Fw* e *katG_Rv*. M: Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus; **Amostra 1:** Produto de PCR *katG* de *M. tuberculosis* H37Rv; **2:** H37Rv INH 1#1; **3:** H37Rv INH 1#2; **4:** H37Rv INH 1#3; **5:** H37Rv INH 1#13; **6:** H37Rv INH 1#26; **7:** controlo negativo; **8:** 359/03; **9:** 359/03 INH 1#1; **10:** 359/03 INH 1#11; **11:** 359/03 INH 1#33.

3.4 Efeito de compostos inibidores de bombas de efluxo na susceptibilidade à isoniazida

Uma vez que as culturas adaptadas à isoniazida H37Rv INH 1#2 e 359/03 INH 1#33, ambas com valores de CMI para a isoniazida de 256 µg/ml, não apresentam mutações detectáveis pelos métodos utilizados em *katG* ou *inhA*, os principais genes envolvidos na resistência à isoniazida (52), foi avaliada a sobre-actividade de sistemas de efluxo nestas estirpes que possam explicar estes níveis de resistência. Para isso, determinaram-se as CMIs para estas culturas na ausência e na presença de compostos que se sabe actuarem como inibidores de bombas de efluxo.

Os compostos seleccionados foram a tioridazina e o verapamil, dois compostos conhecidos como inibidores de bombas de efluxo (181,182). De modo a não comprometer a viabilidade celular, a concentração máxima de inibidor testado em combinação com a isoniazida corresponde a ½ do valor de CMI para cada inibidor.

Estes valores foram determinados neste trabalho, verificando-se que tanto H37Rv como 359/03 apresentam valores de CMI de 15 µg/ml para a tioridazina e de 256 µg/ml para o verapamil.

A estirpe H37Rv original apresenta uma concentração mínima inibitória de 0,1 µg/ml de isoniazida e a estirpe 359/03 apresenta uma concentração mínima inibitória de 0,05 µg/ml de isoniazida. Os resultados das CMIs para a isoniazida das culturas adaptadas na ausência e na presença dos inibidores encontram-se na Tabela 28.

Tabela 28. Valores de CMI para a isoniazida referente às culturas originais e adaptadas, na presença de compostos inibidores de bombas de efluxo.

Cultura	CMI (µg/ml)		
	INH	INH + TZ ⁽¹⁾	INH + VP ⁽¹⁾
H37Rv INH 1#2	256	128	0,06
359/03 INH 1#33	256	128	0,03

INH: isoniazida; TZ: tioridazina; VP: verapamil. (1) As concentrações de TZ e VP utilizadas correspondem a metade da sua CMI; 7,5 µg/ml e 128 µg/ml, respectivamente.

Da análise destes resultados, verifica-se que para ambas as culturas, ocorre uma diminuição da CMI para a isoniazida na presença dos inibidores, mas que, enquanto com a tioridazina, essa diminuição é de apenas uma diluição, com o verapamil verifica-se uma diminuição muito significativa, de 256 µg/ml para 0,06 µg/ml, no caso da H37Rv INH 1#2 e para 0,03 µg/ml, no caso da 359/03 INH 1#33.

Apesar do efeito evidente dos inibidores utilizados, em particular do verapamil, na CMI para a isoniazida das duas culturas testadas, este resultado só terá relevância clínica se com a sua aplicação, for possível reverter um fenótipo “cl clinicamente resistente” para “cl clinicamente susceptível”. Deste modo, o efeito dos inibidores de bombas de efluxo na reversão do fenótipo de resistência à isoniazida das culturas H37Rv INH 1#2 e 359/03 INH 1#33 foi avaliado com recurso à realização de um teste de susceptibilidade na presença de cada um dos inibidores seleccionados, com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 (Tabela 29).

Tabela 29. Perfil de susceptibilidade na presença e ausência de compostos inibidores de bombas de efluxo.

Cultura	Teste de susceptibilidade para a isoniazida		
	Ausência de inibidor	Com inibidor	
		TZ ⁽¹⁾	VP ⁽¹⁾
H37Rv INH 1#2	Resistente à INH	Resistente à INH	Susceptível à INH
359/03 INH 1#33	Resistente à INH	Resistente à INH	Susceptível à INH

INH: isoniazida; TZ: tioridazina; VP: verapamil. (1) As concentrações de TZ e VP utilizadas correspondem a metade da sua CMI; 7,5 µg/ml e 128 µg/ml, respectivamente.

Da análise dos dados apresentados na Tabela 29, verifica-se que ocorreu reversão do fenótipo de resistência à isoniazida com o composto verapamil para as duas culturas testadas, H37Rv INH 1#2 e 359/03 INH 1#33. Relativamente à tioridazina, apesar de esta não ter revertido o fenótipo de resistência à isoniazida, notou-se um atraso no tempo de detecção de crescimento nas culturas quando comparado com o teste de susceptibilidade realizado sem inibidor (exemplificado na Figura 21 para a cultura 359/03 INH 1#33).

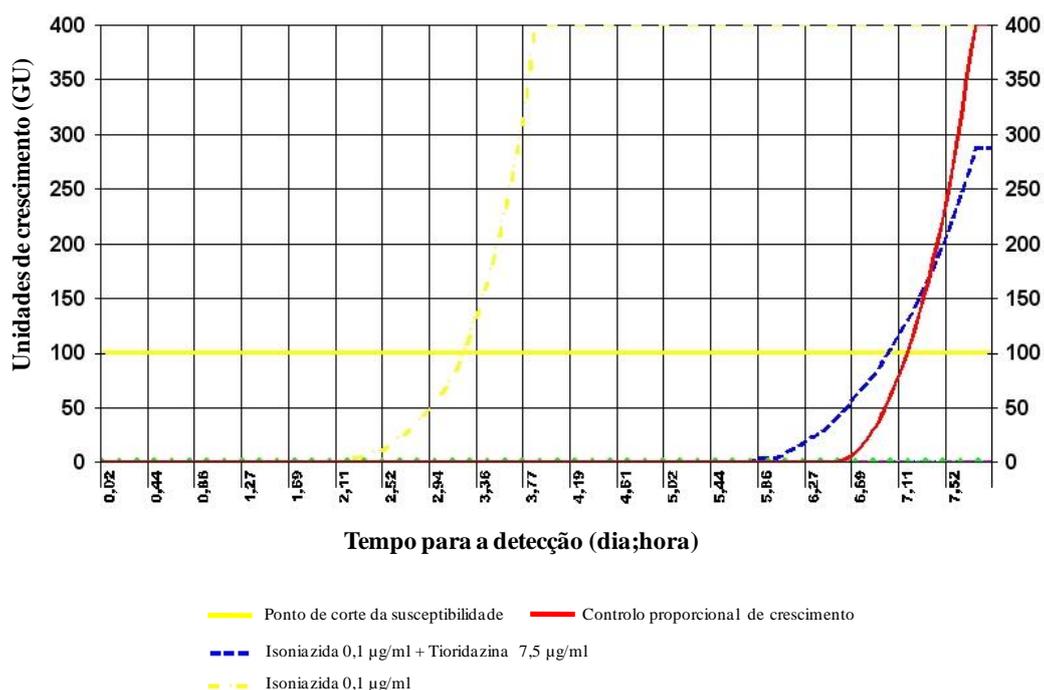


Figura 21. Teste de susceptibilidade da cultura 359/03 INH 1#33 para a isoniazida na presença de tioridazina. O gráfico foi obtido com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 (Epicenter/TB eXIST).

3.5 Quantificação da expressão de genes que codificam para bombas de efluxo por qRT-PCR

Dados os resultados anteriores que evidenciam o claro efeito dos inibidores de bombas de efluxo na redução do nível de resistência à isoniazida procurou-se determinar se existe sobre-actividade de sistemas de efluxo nas estirpes adaptadas. Os alvos desta pesquisa foram os genes *mmpL7* (*Rv2942*), *tap* (*Rv1258c*), *P55* (*Rv1410c*), *efpA* (*Rv2846c*) e *mmr* (*Rv3065*), seleccionados de uma vasta lista de genes que codificam proteínas com actividade de efluxo em *M. tuberculosis*.

A análise da expressão relativa dos genes em estudo foi realizada nas culturas que apresentam um elevado nível de resistência para a isoniazida sem mutação detectável pelos métodos utilizados, H37Rv INH 1#2 e 359/03 INH 1#33. A quantificação da expressão relativa destes genes foi realizada por qRT-PCR (Tabelas 30 e 31).

Tabela 30. Níveis de expressão dos genes que codificam para bombas de efluxo em *M. tuberculosis* na cultura H37Rv INH 1#2, em relação à sua expressão na estirpe original H37Rv.

Gene	Nível de expressão relativa
<i>mmpL7</i> (Rv2942)	8 ± 2,38
<i>tap</i> (Rv1258c)	16 ± 1,16
<i>P55</i> (Rv1410c)	13 ± 2,23
<i>efpA</i> (Rv2846c)	9,85 ± 1,41
<i>mmr</i> (Rv3065)	16,65 ± 2,44

Um nível de expressão relativa igual a 1 indica que o nível de expressão génica é igual à da estirpe com que está a ser comparada. Considera-se que existe sobreexpressão para valores iguais ou superiores a 4. Cada ensaio foi realizado em triplicado.

Tabela 31. Níveis de expressão dos genes que codificam para bombas de efluxo em *M. tuberculosis* na cultura 359/03 INH 1#33, em relação à sua expressão na estirpe original 359/03.

Gene	Nível de expressão relativa
<i>mmpL7</i> (Rv2942)	13,96 ± 1,36
<i>tap</i> (Rv1258c)	9,01 ± 2,17
<i>P55</i> (Rv1410c)	8,53 ± 2,86
<i>efpA</i> (Rv2846c)	10,66 ± 2,07
<i>mmr</i> (Rv3065)	11,46 ± 4,9

Um nível de expressão relativa igual a 1 indica que o nível de expressão génica é igual à da estirpe com que está a ser comparada. Considera-se que existe sobreexpressão para valores iguais ou superiores a 4. Cada ensaio foi realizado em triplicado.

Da análise das Tabelas 30 e 31 verifica-se que existe sobreexpressão dos cinco genes testados, nas duas culturas testadas, em relação à estirpe original. No caso da cultura H37Rv INH 1#2, esta sobreexpressão é maior para os genes *mmr*, *tap* e *P55*, enquanto para a cultura 359/03 INH 1#33 se verifica maior sobreexpressão dos genes *mmpL7* e *mmr*.

Nas Figuras 22 a 25 apresenta-se resumida a caracterização fenotípica e genotípica realizada nas estirpes H37Rv e 359/03, originais e adaptadas.

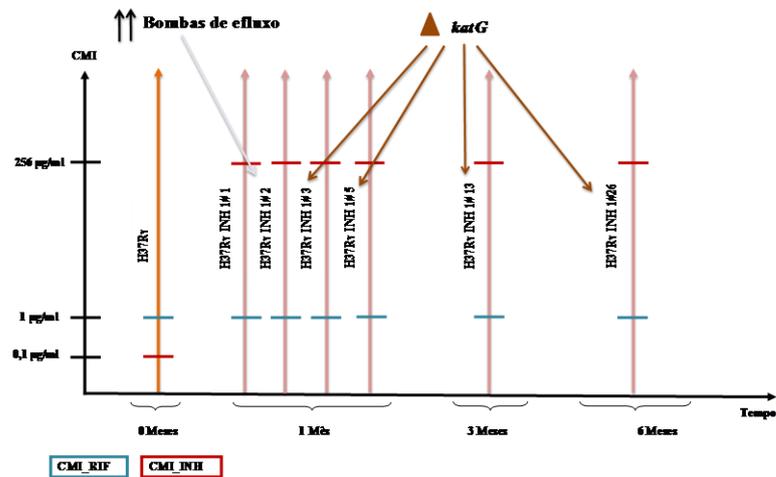


Figura 22. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas H37Rv resultantes da adaptação a 0,1 µg/ml de isoniazida (barras rosa) e respectiva caracterização genética. A barra laranja corresponde à estirpe original H37Rv. CMI: concentração mínima inibitória; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; ↑: detecção de sobreexpressão de cinco genes de bombas de efluxo; Δ: ocorrência de uma deleção no gene *katG*.

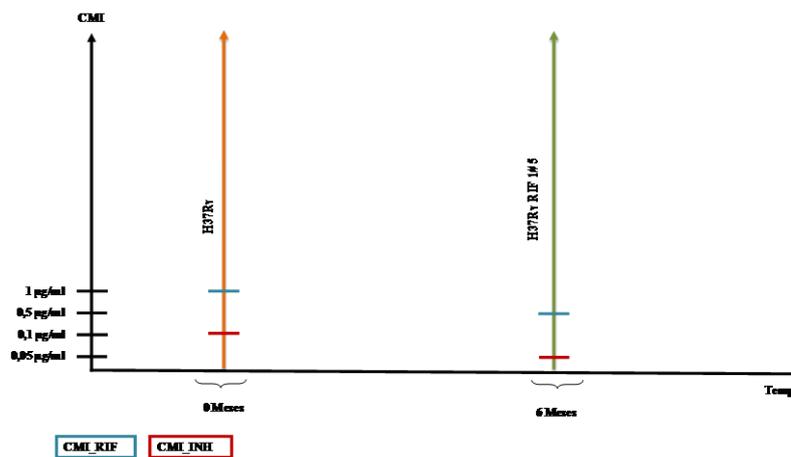


Figura 23. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas H37Rv resultantes da adaptação a 1 µg/ml de rifampicina (barra verde). A barra laranja corresponde à estirpe original H37Rv. CMI: concentração mínima inibitória; INH: isoniazida; RIF: rifampicina.

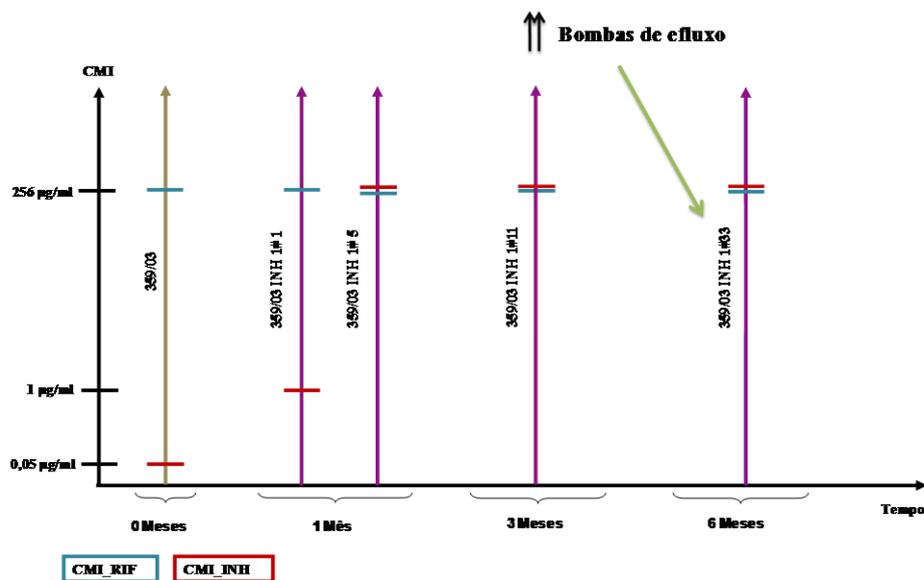


Figura 24. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas 359/03 resultantes da adaptação a 0,1 µg/ml de isoniazida (barras lilás) e respectiva caracterização genética. A barra bege corresponde à estirpe original 359/03. CMI: concentração mínima inibitória; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; ↑: detecção de sobreexpressão de cinco genes de bombas de efluxo.

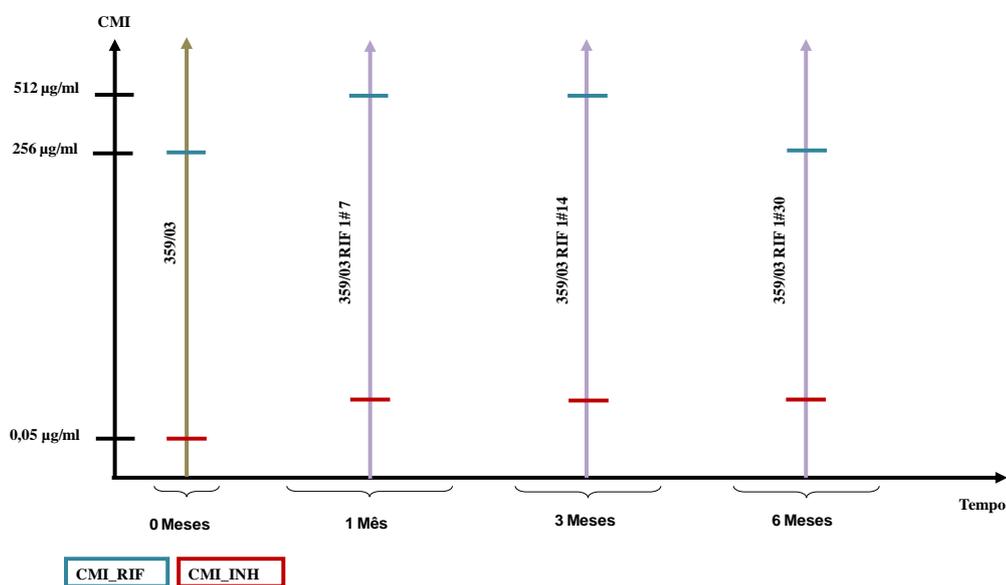


Figura 25. Representação esquemática da evolução dos níveis de susceptibilidade das culturas 359/03 resultantes da adaptação a 1 µg/ml de rifampicina (barras violeta). A barra bege corresponde à estirpe original 359/03. CMI: concentração mínima inibitória; INH: isoniazida; RIF: rifampicina.

3.6 Determinação de taxas de mutação

Da análise das Figuras 22 a 25 verifica-se que enquanto no processo de adaptação à isoniazida as duas estirpes testadas sofreram alterações nas suas CMI's, quer para a isoniazida, quer para a rifampicina, alterações essas que podemos correlacionar com a alteração dos alvos genéticos ou sobreexpressão de bombas de efluxo, durante o processo de adaptação à rifampicina, não se verificaram alterações significativas. Neste caso, espera-se que a ocorrer alterações, elas surjam com maior frequência na estirpe monorresistente à rifampicina, como resultado da actividade alterada desta polimerase. Embora tais alterações não tenham sido detectadas, o cálculo das taxas de mutação para as duas estirpes deverá dar uma indicação se esta hipótese está ou não correcta.

Assim, determinaram-se as taxas de mutação para as estirpes H37Rv e 359/03 relativamente à isoniazida, através do teste de flutuação (Tabelas 32 e 33).

Tabela 32. Aplicação do teste de flutuação à estirpe H37Rv para determinação da frequência e taxa de mutação para a isoniazida.

	Isoniazida	
	0,2 µg/ml	1 µg/ml
Número de culturas	12	12
Volume de cultura	5 ml	5 ml
Volume de amostra	0,1 ml	0,1 ml
Média de mutantes por ml	361,5833	354,3333
Média de bactérias por ml (células no momento do teste)	$1,02 \times 10^8$	$1,02 \times 10^8$
Frequência de mutação	$3,55 \times 10^{-6}$	$3,48 \times 10^{-6}$
Média da frequência de mutação	$3,51 \times 10^{-6}$	
Taxa de mutação	$5,45 \times 10^{-7}$	$5,35 \times 10^{-7}$
Média da taxa de mutação	$5,40 \times 10^{-7}$	

NA: não aplicável.

Tabela 33. Aplicação do teste de flutuação à estirpe 359/03 para determinação da frequência e taxa de mutação para a isoniazida.

	Isoniazida	
	0,2 µg/ml	1 µg/ml
Número de culturas	9	9
Volume de cultura	5 ml	5 ml
Volume de amostra	0,1 ml	0,1 ml
Média de mutantes por ml	363,889	154,667
Média de bactérias por ml (células no momento do teste)	$8,42 \times 10^6$	$8,42 \times 10^6$
Frequência de mutação	$4,32 \times 10^{-5}$	$1,83 \times 10^{-5}$
Média da frequência de mutação	$3,08 \times 10^{-5}$	
Taxa de mutação	$6,9 \times 10^{-6}$	$3,32 \times 10^{-6}$
Média da taxa de mutação	$5,11 \times 10^{-6}$	

NA: não aplicável.

Através da análise das Tabelas 32 e 33 verifica-se que a estirpe H37Rv apresenta, para a isoniazida uma frequência de mutação de $3,51 \times 10^{-6}$ e uma taxa de mutação de $5,40 \times 10^{-7}$, enquanto a estirpe 359/03 apresenta uma frequência de mutação de $3,08 \times 10^{-5}$ e uma taxa de mutação de $5,11 \times 10^{-6}$ para a isoniazida. Verifica-se assim que a estirpe monorresistente apresenta uma taxa de mutação para a isoniazida superior à da estirpe H37Rv.

Foi também efectuado o cálculo das frequências e taxas de mutação para a rifampicina, que foram de $8,59 \times 10^{-8}$ e $2,71 \times 10^{-8}$, respectivamente, para a estirpe H37Rv, e de $2,80 \times 10^{-1}$ e $2,42 \times 10^{-2}$ para a estirpe 359/03, respectivamente.

4. Discussão e conclusões

A tuberculose continua a ser uma das principais ameaças à saúde pública. Actualmente existem cerca de 9 milhões de pessoas infectadas com *M. tuberculosis*, 511 mil casos de tuberculose multirresistente e até ao final de 2008, 55 países referiram a existência de pelo menos um caso de tuberculose extensivamente resistente (114). Portugal possui uma das taxas mais elevadas de casos de tuberculose pulmonar da Europa Ocidental e uma das frequências mais elevadas de casos de tuberculose multirresistente. De todos os casos de tuberculose multirresistente reportados em 2007, 48% referem-se a casos de tuberculose extensivamente resistente, sendo que 68% estão localizados da região de saúde de Lisboa (43).

Neste contexto, a implementação em tempo útil de uma terapêutica adequada é essencial para o tratamento da infecção, sendo importante não só o tipo de acção de cada antibacilar, mas também a dosagem a que é utilizado. A concentração dos antibacilares necessária para eliminar *in vivo* os bacilos corresponde aos valores de concentração mínima inibitória obtidos *in vitro* (144). No entanto, existem parâmetros que estão relacionados com o hospedeiro e que vão influenciar os níveis de concentração sérica dos antibióticos, podendo gerar níveis sub-inibitórios dos antibacilares durante a terapêutica anti-tuberculosa e conduzir à emergência da resistência em *M. tuberculosis*. Para compreender quais os mecanismos que levam ao desenvolvimento da multirresistência em *M. tuberculosis*, neste trabalho pretendeu-se mimetizar o que acontece quando um doente está sob terapêutica durante o esquema terapêutico de curta duração (6 meses). Para tal, estudaram-se os processos “evolutivos” de duas estirpes, a estirpe de referência H37Rv, susceptível aos cinco antibacilares de primeira linha, e uma estirpe clínica monorresistente à rifampicina, resistência conferida pela mutação mais prevalente no gene *rpoB*, S531L. Ambas as estirpes foram expostas a 0,1 µg/ml de isoniazida e a 1 µg/ml rifampicina, independentemente. O processo de adaptação ocorreu durante várias gerações, *in vitro*, em condições nutritivas e ambientais controladas, tendo como parâmetro de comparação, em cada caso, a estirpe original.

Neste trabalho utilizou-se o sistema BACTEC™ MGIT™ 960, que permitiu monitorizar em contínuo o crescimento das culturas, com obtenção de curvas de crescimento. Os valores de CMI obtidos com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 foram comparados os valores de CMI das mesmas culturas obtidos com sistema BACTEC™ 460-TB. Os valores obtidos foram concordantes em ambos os sistemas, excepto para a resistência intermédia, que apenas é detectada com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960. A introdução deste parâmetro, nível de resistência intermédia, permitiu uma determinação mais precisa do nível de resistência apresentado pelas estirpes em estudo. Springer *et al.* mostraram que o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 tende a classificar mais frequentemente as culturas como resistentes do que o sistema BACTEC™ 460-TB (159). Esta tendência, também verificada neste trabalho, pode dever-se às diferenças tanto na composição dos meios de cultura utilizados, como à técnica em si. O meio MGIT utilizado pelo sistema BACTEC™ MGIT™ 960 é um meio de cultura mais nutritivo do que o meio de cultura MB 7H12 utilizado pelo sistema BACTEC™ 460-TB, potenciando assim o crescimento das estirpes. Por outro lado, embora os dois sistemas determinem o crescimento micobacteriano com base na actividade metabólica, o método utilizado para a sua detecção é bastante diferente. O sistema BACTEC™ 460-TB mede o CO₂ radioactivo que é libertado devido ao metabolismo da micobactéria e para isso a fase gasosa do frasco necessita de ser removida e substituída diariamente. Em contraste, o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 utiliza um sensor fluorescente que mede o consumo de oxigénio para a detecção do crescimento micobacteriano, sem necessitar de manipulação do tubo com a cultura. Quando o crescimento de estirpes resistentes é muito lento, *p.e.*, próximo da CMI, é esperado que o BACTEC™ 460-TB dê resultados de falsa susceptibilidade, como resultado da constante depleção do pouco CO₂ produzido (159). Este facto é preocupante, uma vez que estirpes de *M. tuberculosis* com taxas de crescimento excepcionalmente reduzidas aparecem associadas à multirresistência. Deste modo, torna-se vantajosa a determinação de CMIs e testes de susceptibilidade usando o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 em conjunto com o “software” Epicenter/TB-eXIST, não só pela maior fidelidade do sistema de detecção mas também por permitir que as culturas sejam incubadas por um período adicional que pode ir até um máximo de 28 dias. Neste trabalho verificou-se que com o sistema BACTEC™ 460-TB, um nível de

resistência intermédio obtido com o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 tanto pode ser interpretado como resistente ou como susceptível para a concentração em causa.

Durante o processo de adaptação a 0,1 µg/ml de isoniazida, verificou-se que ambas as estirpes passaram de um fenótipo de susceptibilidade para um fenótipo de resistência à isoniazida. Quando exposta à isoniazida, a estirpe de referência rapidamente adquire resistência, passando de uma CMI de 0,1 para 256 µg/ml, logo após a primeira passagem em meio com isoniazida. A estirpe clínica monorresistente à rifampicina, sujeita à mesma pressão selectiva, demorou mais tempo a adquirir resistência à isoniazida, necessitando de cinco passagens para passar de uma CMI de 0,05 µg/ml para 256 µg/ml. A pesquisa de eventuais mutações nos genes *katG* e *inhA* demonstrou que a partir da terceira passagem em meio suplementado com isoniazida, ocorreu uma deleção no gene *katG* na estirpe de referência. No caso da estirpe clínica monorresistente à rifampicina, após 33 passagens em meio suplementado com isoniazida não foram encontradas deleções/mutações nos genes *katG* ou *inhA* (nas zonas cobertas pelo sistema de detecção utilizado) apesar do seu elevado valor de CMI. O facto de não se terem encontrado mutações nestes genes nas culturas H37Rv INH 1#2 e 359/03 INH 1#33 sugere ou a ocorrência de outras mutações ou actividade de sistemas de efluxo, capazes de levar a cabo a extrusão da isoniazida para o exterior das células.

Deste modo, foram seleccionados cinco genes descritos na literatura como codificando para bombas de efluxo responsáveis pela extrusão da isoniazida em *M. tuberculosis* e a sua expressão relativa quantificada por qRT-PCR. O conjunto de genes cuja expressão foi estudada neste trabalho inclui genes cujos produtos estão envolvidos quer no transporte de substâncias tóxicas ou produtos resultantes do seu metabolismo para o exterior da célula, quer na prevenção da entrada de componentes tóxicos por redução da permeabilidade da membrana celular (86). No entanto, pouco se sabe acerca da sua função específica na célula micobacteriana, sendo que os melhores estudados até à data são os genes *mmpL7*, *efpA* e *P55*.

O gene *tap* (*Rv1258c*) codifica para a proteína Tap que pertence à superfamília MFS e está associada à extrusão de aminoglicosídeos e tetraciclina em *M. smegmatis* (2) e de

tetraciclina, isoniazida, rifampicina e ofloxacina em *M. tuberculosis* (2,71,147). O gene *mmr* (*Rv3065*) codifica a proteína transmembranar Mmr, um membro da família SMR, responsável pelo transporte de uma variedade de substâncias (38). O gene *mmpL7* (*Rv2942*) de *M. tuberculosis* codifica para um transportador hipotético pertencente à família RND e confere resistência de elevado nível à isoniazida quando é expresso em *M. smegmatis* (116). O genoma de *M. tuberculosis* contém 13 genes que codificam para proteínas da superfamília RND designadas por MmpL (Mycobacterial membrane protein Large) (28). Entre os vários possíveis substratos das proteínas MmpL encontram-se os lípidos e ácidos micólicos presentes no envelope celular micobacteriano (44). Duas das proteínas MmpL, a MmpL7 e a MmpL8, estão envolvidas no transporte de lípidos ramificados no grupo metil, presentes na parede celular de *M. tuberculosis*. A proteína MmpL7 tem sido associada ao transporte de “phthiocerol dimycocerosate” (PDIM) (18). A proteína MmpL7, quando expressa em *M. smegmatis* utiliza a isoniazida como substrato, enquanto que, em *M. tuberculosis*, a isoniazida pode competir com o substrato natural (PDIM) da proteína MmpL7, uma vez que a sua principal função na célula é o transporte de lípidos para a parede celular (31). A sobreexpressão do gene *mmpL7* em *M. tuberculosis* pode ser responsável pela resistência de baixo nível à isoniazida em isolados clínicos nos quais não foram encontradas mutações nos genes conhecidos como responsáveis por esta resistência (116).

A proteína EfpA, codificada pelo gene *efpA* (*Rv2846c*), foi a primeira proteína de efluxo (superfamília MFS) a ser descrita em *M. tuberculosis* (45). No entanto, não foi possível demonstrar a ligação entre a proteína EfpA e a resistência aos antibióticos em *M. tuberculosis* (45). No entanto, o facto da expressão do gene *efpA* ser induzida na presença da isoniazida, sugere que a proteína EfpA medeia uma função essencial na síntese de ácidos micólicos (122). O gene *efpA* possui uma distribuição limitada, encontrando-se apenas em espécies de micobactérias patogénicas (45). Isto sugere que a proteína EfpA possui papel na virulência da bactéria, o que pode estar associado ao seu provável envolvimento na biosíntese de ácidos micólicos, ou com a destoxificação celular através do transporte de antibióticos e/ou produtos resultantes da acção de defesa do sistema imunitário.

A proteína P55, codificada pelo gene *P55 (Rv1410c)* e pertencente à superfamília MFS (150), possui um papel importante em pelo menos três processos celulares: extrusão e resistência a antibióticos; resposta celular contra o “stress” oxidativo; e manutenção do crescimento normal da célula (129). Uma vez que a proteína de efluxo P55 pode participar no transporte de lípidos através da membrana (47), a sua inibição poderá ter um efeito na biosíntese do envelope celular em *M. tuberculosis*. Qualquer deficiência no transporte de lípidos através da membrana celular vai afectar a integridade da célula, tornando a estirpe mais susceptível ao antibiótico (129). Por outro lado, tal como a proteína *efpA*, proteína P55 é uma peça importante nos sistemas de destoxificação celular que estão ligados aos processos respiratórios sendo também importante na manutenção do balanço oxidativo da célula. Em *M. tuberculosis*, a bomba de efluxo P55 é capaz da extrusão de antibióticos tais como a isoniazida, rifampicina e ofloxacina (71).

Os ensaios de qRT-PCR indicam que apesar dos cinco genes por nós estudados, *mmpL7 (Rv2942)*, *tap (Rv1258c)*, *P55 (Rv1410c)*, *efpA (Rv2846c)* e *mmr (Rv3065)*, se encontrarem sobreexpressos nas culturas adaptadas à isoniazida H37Rv INH 1#2 e 359/03 INH 1#33, não é possível realçar a sobreexpressão de um gene em particular. Apesar das proteínas de efluxo estarem relacionadas com a extrusão de antibióticos e outras substâncias através da parede celular, são raros os estudos que demonstrem a sua sobreexpressão em *M. tuberculosis*. Até à data, existem três estudos realizados (53,71,190) nos quais os autores demonstraram, por qRT-PCR, que existem diferenças na expressão de genes das superfamílias MFS e ABC. Em relação à bomba de efluxo Mmr (família SMR), não existe informação na literatura que indique a isoniazida como um dos substratos desta bomba de efluxo. Os possíveis substratos descritos para esta bomba de efluxo são variados e incluem a eritromicina, brometo de etídeo, acriflavina, safranina O, apenas para referir alguns. No entanto, pelos nossos resultados de qRT-PCR, verifica-se que a expressão deste gene é induzida pela isoniazida, sendo a primeira vez que a sobreexpressão do gene *mmr* é associada à exposição à isoniazida.

A utilização de compostos inibidores de bombas de efluxo permitiu-nos verificar a existência de actividade de efluxo nas culturas expostas à isoniazida H37Rv INH 1#2 e

359/03 INH 1#33, através da reversão da resistência à isoniazida pelo verapamil e do aumento do tempo necessário para a detecção de crescimento nas culturas na presença de tioridazina. Apesar de não se terem encontrado mutações associadas à resistência à isoniazida na estirpe 359/03 INH 1#33, é difícil justificar que o elevado nível de resistência à isoniazida seja conferido apenas pela sobreexpressão de bombas de efluxo. Os sistemas utilizados para detecção de mutações que conferem resistência avaliam um espectro de mutações limitado, pelo que não podemos excluir a existência de outras mutações que confirmam resistência à isoniazida. É importante referir que a maioria das proteínas transportadoras por nós estudadas estão de alguma forma envolvidas na biosíntese de ácidos gordos e “stress” oxidativo, quer pelo transporte de lípidos através da membrana celular, quer pela destoxificação da célula devido à acumulação de produtos tóxicos (antibióticos e/ou seus produtos metabólicos). Os resultados obtidos no ensaio da catalase, que indicam que esta enzima vai perdendo actividade ao longo do processo de exposição à isoniazida, sugerem igualmente a perturbação dos sistemas de destoxificação da célula durante este processo, o que poderá explicar a sobreexpressão destes transportadores. Esta sobreexpressão poderá também estar relacionada com o facto de estas proteínas estarem envolvidas na síntese da parede celular, que é o alvo da isoniazida. Ramaswamy *et al.* mostraram que na resistência à isoniazida estão envolvidos genes cujos produtos participam na biosíntese de ácidos micólicos ou genes que estão sobreexpressos em resposta ao aumento dos níveis toxicidade celular resultante da acção da isoniazida (128).

O outro mecanismo de resistência observado para estirpe H37Rv face à pressão imposta pela isoniazida, foi a ocorrência de uma deleção no gene *katG*, que neste caso foi acompanhada de perda total da actividade de catalase. Outros autores verificaram a ocorrência *in vitro* de deleção total ou parcial do gene *katG*, em estirpes pressionadas com isoniazida (11). Tem também sido descrito, embora raramente, o aparecimento de isolados clínicos resistentes à isoniazida com deleção total/parcial do gene *katG* (179). No entanto, a ocorrência de mutações pontuais, principalmente a mutação S315T no gene *katG*, continua a ser o principal mecanismo de resistência entre os isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida (6,29,52,57,176,178).

A segunda parte do nosso estudo consistiu na adaptação das estirpes H37Rv e 359/03 a 1 µg/ml de rifampicina. Os resultados obtidos durante a exposição sucessiva de ambas as estirpes a esta concentração de rifampicina sugerem uma associação entre a resistência à rifampicina e o “fitness” bacteriano. O “fitness” bacteriano refere-se ao desempenho de um microrganismo face a condições ambientais adversas, em relação à sua capacidade de sobrevivência e sucesso na transmissão (26). A resistência à rifampicina resulta de mutações no gene *rpoB*, que codifica para a subunidade β da RNA polimerase. Esta enzima é essencial para a transcrição do RNA e consequentemente para a viabilidade da célula. Tipicamente, as mutações ocorrem na RRDR do gene *rpoB*, com uma elevada propensão para a ocorrência de mutações específicas (codões 516, 526 e 531). Em ambas as estirpes adaptadas à rifampicina, verificou-se uma variação no seu “fitness”. A estirpe clínica seleccionada para este estudo possui a mutação S531L no gene *rpoB* enquanto que a estirpe de referência H37Rv não possui qualquer mutação neste gene. Durante o processo de adaptação à rifampicina, verificou-se ser necessário um tempo cada vez mais prolongado para a detecção de crescimento desta estirpe, tendo-se igualmente observado que a exposição prolongada a este antibacilar provoca alterações morfológicas marcantes. Isto sugere um efeito nocivo por parte do antibiótico no “fitness” da população mutante residual desta estirpe, conforme esperado. Na estirpe clínica, o processo de adaptação a 1 µg/ml de rifampicina sugere também um efeito no “fitness”, verificado apenas por pequenas alterações nas CMI's determinadas referentes às culturas seleccionadas durante o processo. No entanto este efeito não foi considerado significativo.

O crescimento normal de uma estirpe depende fortemente da sua taxa de transcrição génica. Mutações que alteram a RNA polimerase tanto podem diminuir como permitir uma maior eficiência na transcrição e deste modo aumentar a taxa de crescimento de estirpes, levando ao aparecimento de mutações noutros genes que de outro modo não iriam ser seleccionadas devido ao facto de representarem um elevado custo biológico. Estudos realizados em *E. coli* indicam que existe uma relação directa entre o custo da aquisição de mutações no gene *rpoB* e os seus efeitos na transcrição; se o custo associado à mutação for elevado, este irá exercer um efeito negativo na transcrição (131).

Estirpes de *M. tuberculosis* com a mutação S531L possuem um maior potencial para compensar a aquisição de resistência através do aparecimento de mutações noutras locais e assim disseminar-se com mais facilidade (50,70). Num estudo recente foi verificado que a evolução da resistência à rifampicina aparece em resposta a factores ambientais tais como uma redução do pH ambiental, causando a sobreexpressão das polimerases propensas a erros e resultando numa maior diversidade de mutações (70). Por exemplo, uma descida dramática do pH reduz a vantagem conferida pela mutação S531L, tornando a estirpe permissiva a uma variedade de mutações podendo também permitir-lhe alterar o repertório de polimerases que estão a ser expressas, resultando num decréscimo da fidelidade da replicação de DNA. Verifica-se assim que um aumento do espectro mutacional confere a *M. tuberculosis* uma vantagem adaptativa num ambiente em alteração (70). Num outro estudo, Bergval *et al.*, sugerem um outro mecanismo de compensação, mostrando que o gene *dnaE2*, que codifica para uma polimerase de DNA, se encontra sobreexpresso em estirpes de *M. tuberculosis* devido à exposição aos radicais de oxigénio e nitrogénio gerados durante a infecção no hospedeiro (10). No entanto, a sobreexpressão deste gene ocorre em estirpes com mutações no gene *rpoB* que são raramente descritas, S522L, S531W e V176F, ou pouco frequentes como é o caso da mutação H526D. Estes resultados sugerem que a sobreexpressão deste gene pode ocorrer como resposta ao elevado custo biológico causado pelas mutações encontradas levantando a possibilidade de que as mutações no gene *rpoB* geram uma resposta constitutiva face ao “stress” imposto, aumentando a probabilidade de uma adaptação subsequente (10).

No nosso estudo não foram encontradas mutações no gene *rpoB* da estirpe H37Rv e culturas derivadas, não se tendo encontrado também outras mutações no gene *rpoB* da estirpe clínica, para além da mutação pré-existente. Também não foram detectadas mutações nos genes *katG* e *inhA* ao longo do processo de adaptação à rifampicina. Não podemos no entanto excluir a presença de mutações em outras zonas dos genes estudados, uma vez que os instrumentos utilizados neste trabalho para detecção de mutações estão limitados a mutações específicas nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA*, não cobrindo portanto toda a gama de mutações possíveis nestes genes.

Com base no pressuposto de que as estirpes resistentes à rifampicina por mutação no gene *rpoB* possuem frequências e taxas de mutação elevadas, durante este trabalho reproduziu-se o teste de flutuação desenvolvido por Luria e Delbrück em 1943 e aplicado pela primeira vez a *M. tuberculosis* pelo Professor Hugo David, em 1970, para determinação de taxas de mutação aos antibacilares de primeira linha. Deste modo pretendeu-se verificar se a estirpe clínica com a mutação S531L no gene *rpoB*, possui uma maior frequência e taxa de mutação para a isoniazida do que a estirpe susceptível H37Rv. As taxas de mutação para a isoniazida foram determinadas na concentração crítica baixa (0,2 µg/ml) e concentração crítica alta (1 µg/ml) para estirpe H37Rv e para a estirpe 359/03. Foram também determinadas as taxas de mutação para a rifampicina. A estirpe H37Rv foi testada na concentração crítica (1 µg/ml) e a estirpe 359/03 foi testada no seu valor de CMI (256 µg/ml). As frequências de mutação obtidas para a estirpe de referência H37Rv estão de acordo com as frequências de mutação descritas anteriormente para a mesma estirpe em relação à isoniazida e rifampicina (34). As taxas de mutação obtidas para a rifampicina e isoniazida (10^{-8} e 10^{-7} respectivamente) são mais elevadas do que no estudo anterior (10^{-10} e 10^{-8} respectivamente). Esta diferença na taxa de mutação da estirpe H37Rv foi também referida por Werngren e Hoffner (189) para a rifampicina. Isto pode dever-se ao facto de a estirpe H37Rv ser uma estirpe laboratorial que possivelmente está mais adaptada aos antibióticos e/ou também às diferentes condições experimentais e temporais em que foram realizados os vários ensaios.

Os resultados obtidos indicam que a estirpe 359/03 possui uma frequência de mutação para a isoniazida 10 vezes superior à frequência de mutação da estirpe H37Rv para o mesmo antibiótico. Já para a rifampicina esta estirpe possui uma elevada frequência de mutação para a concentração testada, o que é consistente com o facto de possuir uma mutação no gene *rpoB*. Relativamente à taxa de mutação da estirpe 359/03 para a isoniazida (10^{-6} mutações por divisão celular) verifica-se que esta é também 10 vezes superior à taxa de mutação da estirpe de referência H37Rv (10^{-7} mutações por divisão celular) para o mesmo antibiótico. Verifica-se assim que a existência de uma RNA polimerase alterada, responsável pela resistência à rifampicina, influencia a taxa de mutação para o outro antibiótico em estudo, a isoniazida, apesar de não apresentar um

fenótipo hipermutável (taxa de mutação 100 vezes superior à da estirpe de referência (189)). Sabe-se que *M. tuberculosis* possui uma deficiência natural nos sistemas relacionados com a reparação de DNA. Esta deficiência foi já associada a estirpes hipermutáveis em outros microrganismos, no entanto, ainda não foi possível observar o fenótipo hipermutável em *M. tuberculosis* (99, 125). Uma possível excepção parece ser a linhagem Beijing que está associada à emergência da multirresistência, embora os ensaios realizados *in vitro* não tenham conseguido associar um fenótipo hipermutável às estirpes Beijing estudadas (189). O comportamento descrito para estas estirpes assemelha-se ao observado no presente trabalho para a estirpe clínica monorresistente à rifampicina.

Os resultados obtidos nesta Dissertação mostram que a passagem consecutiva de duas estirpes de *M. tuberculosis*, uma susceptível a todos os antibacilares e outra monorresistente à rifampicina, em meio suplementado com uma concentração constante de isoniazida resultou num elevado nível de resistência a este antibiótico. A detecção de actividade de genes que codificam para bombas de efluxo para as duas estirpes, após a exposição à isoniazida, sugere que o efluxo providencia uma janela de oportunidade para o desenvolvimento de outros mecanismos de resistência aos antibióticos. O mecanismo de sobreexpressão de bombas de efluxo deverá assim permitir a manutenção de uma população fenotipicamente resistente até que apareça um mutante capaz de se estabelecer na população. Verifica-se pois que o tratamento prolongado com uma dose constante de um antibacilar pode resultar no aumento da resistência a esse mesmo antibacilar, bem como a outros antibióticos não relacionados. Isto é particularmente importante em doentes que não respondem à terapêutica, uma vez que as condições fisiológicas podem variar, sendo a patologia da doença fundamental, já que pode afectar o acesso dos antibióticos ao local da infecção, originando concentrações sub-inibitórias de antibiótico, podendo também resultar na destruição dos tecidos, a qual, aliada à resposta gerada pelo sistema imunitário, resulta na libertação de substâncias nocivas para a célula bacteriana.

Por outro lado, a passagem consecutiva das mesmas estirpes de *M. tuberculosis* em meio suplementado com uma concentração constante com rifampicina não resultou em

nenhuma alteração de fenótipo significativa. No entanto, a comparação das taxas de mutação para a isoniazida calculadas neste trabalho, evidenciam uma maior taxa de mutação para a estirpe monorresistente à rifampicina, apoiando assim a hipótese inicialmente colocada de que neste caso, a presença de uma RNA polimerase alterada poderá aumentar a frequência de mutações noutros genes, conduzindo eventualmente à resistência a outros antibacilares. Caso estes genes adicionais estejam envolvidos na resistência à isoniazida, criam-se assim as condições para a emergência da multirresistência.

Em resumo, os resultados obtidos sugerem a existência de vários mecanismos pelos quais *M. tuberculosis* pode optar, de modo a garantir a sua sobrevivência face à presença do antibiótico: por extrusão do antibiótico mediante a sobreexpressão de bombas de efluxo ou por selecção de fenótipos “mutator”. O aumento da actividade de bombas de efluxo pode permitir a manutenção de uma população resistente num doente que está sob um nível terapêutico sub-ótimo, a partir da qual irão emergir mutantes geneticamente resistentes com uma maior frequência, enquanto os fenótipos “mutator” estão associados a uma maior capacidade de mutação (delecção e/ou mutação pontual).

Enquanto que a resistência de *M. tuberculosis* aos antibacilares mediada por mutações é há muito conhecida, embora ainda pouco caracterizada, a associação da actividade de efluxo com esta mesma resistência é talvez o resultado mais inesperado deste trabalho. De facto, embora esta associação fosse já referida na literatura, os trabalhos que a documentam são ainda escassos. A relevância do efluxo como mecanismo de resistência é corroborada não só pela evolução dos níveis de resistência ao longo do processo de adaptação à isoniazida, mas também pela sua diminuição drástica na presença de compostos inibidores de bombas de efluxo, destacando-se a reversão pelo verapamil do fenótipo de resistência à isoniazida para as duas culturas testadas.

Estes resultados abrem perspectivas muito promissoras na terapia da tuberculose, já que o uso de compostos inibidores de bombas de efluxo como co-adjuvantes da terapia habitual desta infecção poderá representar uma nova estratégia terapêutica para o seu

tratamento e ajudar na prevenção da emergência de estirpes de *M. tuberculosis* multi- e extensivamente resistentes.

5. Referências Bibliográficas

1. Abe, C., I. Kobayashi, S. Mitarai, M. Wada, Y. Kawabe, T. Takashima, K. Suzuki, L. Sng, S. Wang, H.H. Htay and H. Ogat. 2008. Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 2263-2268.
2. Ainsa, J.A., M.C. Blokpoel, I. Otal, D.B. Young, K.A. De Smet and C. Martin. 1998. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **80**: 5836-5843.
3. Alland, D., A.J. Steyn, T. Weisbrod, K. Aldrich and W.R. Jacobs, Jr. 2000. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* iniBAC promoter, a promoter that responds to cell wall biosynthesis inhibition. *J. Bacteriol.* **182**: 1802-1811.
4. André, J.M. 2000. Tratamento médico da tuberculose: os princípios e os fármacos, pp. 389-415. *In* A tuberculose na viragem do milénio (ed), Jaime Pina, Lidel-Edições Técnicas, Lda. Lisboa. Portugal.
5. Aranaz, A., D. Cousins, A. Mateos and L. Dominguez. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1785-1789.
6. Baker, L.V., T.J. Brown, O. Maxwell, A.L. Gibson, Z. Fang, M.D. Yates and F.A. Drobniewski. 2005. Molecular analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from England and Wales reveals the phylogenetic significance of the *ahpC* -46A polymorphism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 1455-1464.

7. **Banerjee, A., E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K.S. Urn, T. Wilson, D. Collins, G. de Lisle and W.R. Jacobs, Jr.** 1994. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. **263**: 227-230.
8. **Behling, C.A., B. Bennett, K. Takayama and R. L. Hunter.** 1993. Development of a Trehalose 6, 6'- Dimycolate model which explains cord formation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **61**: 2296-2303.
9. **Belanger, A.E., G.S. Besra, M.E. Ford, K. Mikusova, J.T. Belisle, P.J. Brennan and J.M. Inamine.** 1996. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 11919-11924.
10. **Bergval, I.L., P.R. Klatser, A.R.J. Schuitema, L. Oskam and R.M. Anthony.** 2007. Specific mutations in the *Mycobacterium tuberculosis rpoB* gene are associated with increased *dnaE2* expression. *FEMS Microbiol. Lett.* **275**: 338-343.
11. **Bergval, I.L., A.R.J. Schuitema, P.R. Klatser and R.M. Anthony.** 2009. Resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* selected *in vitro* do not reflect the *in vivo* mechanism of isoniazid resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**: 515-523.
12. **Billington, O.J., T.D. McHugh and S.H. Gillespie.** 1999. Physiological cost of rifampin resistance induced *in vitro* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1866-1869.
13. **Bishop, P.J. and G. Neumann.** 1970. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle.* **51**: 196-206.

14. **Böddinghaus, B., T. Rogall, T. Flohr, H. Blöcker and E.C. Böttger.** 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1751-1759.
15. **Braibant, M., P. Gilot and J. Content.** 2000. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 449-467.
16. **Brennan, P.J.** 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* **83**: 91-97.
17. **Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele and C.T. Wittwer.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**: 611-622.
18. **Camacho, L.R, P. Constant, C. Raynaud, M.A. Lanéelle, J.A. Triccas, B. Gicquel, M. Daffé and C. Guilhot.** 2001. Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J. Biol. Chem.* **276**: 19845-19854.
19. **Canetti, G., S. Froman, J. Grosset, P. Hauduroy, M. Langerova, H.T. Mahler, G. Meissener, D.A. Mitchison and L. Šula.** 1963. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull. World Health Organ.* **29**: 565-578.
20. **Cardoso, R.F., M.A. Cardoso, C.Q.F. Leite, D.N. Sato, E.M. Mamizuka, R.D.C. Hirata, F. Fiúza de Mello, M.H. Hirata.** 2007. Characterization of *ndh* gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**: 59-61.
21. **Center for Disease Control and Prevention.** 1993. Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance: recommendations of the

Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. **42**: 1-8.

- 22. Center for Disease Control and Prevention.** 2006. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second line drugs worldwide, 2000-2004. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. **55**: 301-305.
- 23. Center for Disease Control and Prevention.** 2009. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. **58**: 7-10.
- 24. Chopra, I., A.J. O'Neill and K. Miller.** 2003. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. Drug Resist. Updat. **6**: 137-145.
- 25. Choudhuri, B.S., S. Bhakta, R. Barik, J. Basu, M. Kundu and P. Chakrabarti.** 2002. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drrA* and *drrB* of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biochem. **367**: 279-285.
- 26. Cohen, T., B. Sommers and M. Murray.** 2003. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet Infect. Dis. **3**: 13-21.
- 27. Colangeli, R., D. Helb, S. Sridharan, J. Sun, M. Varma-Basil, M.H. Hazbon, R. Harbacheuski, N.J. Megjugorac, W.R. Jacobs, Jr., A. Holzenburg, J.C. Sacchettini and D. Alland.** 2005. The *Mycobacterium tuberculosis iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. Mol. Microbiol. **55**: 1829-1840.
- 28. Cole, S.T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry, III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A.**

- Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead and B.G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. **393**: 537-544.
29. Costa, E.R.D., M.O. Ribeiro, M.S.N. Silva, L.S. Arnold, D.C. Rostirolla, P.I. Cafrune, R.C. Espinoza, M. Palaci, M.A. Telles, V. Ritacco, P.N. Suffys, M.L. Lopes, C.L. Campelo, S.S. Miranda, K. Kremer, P.E.A. da Silva, L.S. Fonseca, J.L. Ho, A.L. Kritski and M.L.R. Rossetti. 2009. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and *in vitro* susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol.* **9**: 39-49.
30. Cousins, D., R. Bastida, A. Cataldi, V. Quse, S. Redrobe, S. Dow, P. Duignan, A. Murray, C. Dupont, N. Ahmed, D.J.M. Collins, W.R. Butter, D. Dawson, D. Rodriguez, J. Loureiro, M.I. Romano, A. Alito, M. Zumarraga and A. Bernadelli. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1305-1314.
31. Cox, J.S., B. Chen, M. McNeil and W.R. Jacobs, Jr. 1999. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature*. **402**: 79-83.
32. Daniel, T.M. 2006. The history of tuberculosis. *Respir. Med.* **100**: 1862-1870.
33. Danilchanka, O., C. Mailaender and M. Niederweis. 2008. Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 2503-2511.

34. **David, H.L.** 1970. Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl. Microbiol.* **20**: 810-814.
35. **David, H. L.** 1989. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Institute Pasteur, Paris.
36. **Davidson, L.A. and K. Takayama.** 1979. Isoniazid inhibition of the synthesis of monounsaturated long-chain fatty acids in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**: 104-105.
37. **De Beenhouwer, H., Z. Lhiang, G. Jannes, W. Mijs, L. Machtelinckx, R. Rossau, H. Traore and F. Portaels.** 1995. Rapid detection of rifampin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tuber. Lung Dis.* **76**: 425-430.
38. **De Rossi, E., M. Branzoni, R. Cantoni, A. Milano, G. Riccardi and O. Ciferri.** 1998. *mmr*, a *Mycobacterium tuberculosis* gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors. *J. Bacteriol.* **180**: 6068-6071.
39. **De Rossi, E., P. Arrigo, M. Bellinzoni, P.A. Silva, C. Martin, J.A. Ainsa, P. Gugliera and G. Riccardi.** 2002. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Med.* **8**: 714-724.
40. **De Rossi, E., J.A. Aínsa and G. Riccardi.** 2006. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 36-52.
41. **Dessen, A., A. Quemard, J.S. Blanchard, W.R. Jacobs Jr., J.C. Sacchettini.** 1995. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* **267**: 1638-1641.

- 42. Direcção Geral de Saúde.** 2007. Circular Informativa Nº 14/DT de 05/06/07. Centro de referência para a Tuberculose Multirresistente. Direcção Geral de Saúde do Ministério da Saúde de Portugal, Lisboa, Portugal.
- 43. Direcção Geral de Saúde.** 2009. Situação epidemiológica da tuberculose e resultados em Dezembro de 2008. Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose (PNT), Março de 2009. Ministério da Saúde, Lisboa, Portugal.
- 44. Domenech, P., M.B. Reed, and C.E. Barry, III.** 2005. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect. Immun.* **73**: 3492-3501.
- 45. Doran, J.L., Y. Pang, K.E. Mdluli, A.J. Moran, T.C. Victor, R.W. Stokes, E. Mahenthalingam, B.N. Kreiswirth, J.L. Butt, G.S. Baron, J.D. Treit, V.J. Kerr, P.D. van Helden, M.C. Roberts and F.E. Nano.** 1997. *Mycobacterium tuberculosis* *efpA* encodes an efflux protein of the QacA transporter family. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**: 23-32.
- 46. du Toit, L.C., V. Pillay and M.P. Danckwerts.** 2006. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. *Respir. Res.* **7**: 1-18.
- 47. Farrow, M.F. and E.J. Rubin.** 2008. Function of a mycobacterial major facilitator superfamily pump requires a membrane associated lipoprotein. *J. Bacteriol.* **190**: 1783-1791.
- 48. Finken, M., P. Kirschner, A. Meier, A. Wrede and E.C. Böttger.** 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.* **9**: 1239-1246.

- 49. Gagneux, S., C.D. Long, P.M. Small, T. Van, G.K. Schoolnik and B.J.M. Bohannan.** 2006. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. **30**: 1944-1946.
- 50. Gillespie, S.H.** 2002. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 267-274.
- 51. Glynn, J.R., J. Whiteley, P.J. Bifani, K. Kremer and D. van Soolingen.** 2002. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 843-849.
- 52. Guo, H., Q. Seet, S. Denkin, L. Parsons and Y. Zhang.** 2006. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *J. Med. Microbiol.* **55**: 1527-1531.
- 53. Gupta, A.K., D.S. Chauhan, K. Srivastava, R. Das, S. Batra, M. Mittal, P. Goswami, N. Singhal, V.D. Sharma, K. Venkatesan, S.E. Hasnain and V.M. Katoch.** 2006. Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its correlation with expression levels of two major efflux pumps in mycobacteria. *J. Commun. Dis.* **38**: 246-254.
- 54. Hale, Y.M., G.E. Pfyffer and M. Salfinger.** 2001. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. *Clin. Infect. Dis.* **33**: 834-46.
- 55. Hanekom, M., G.D. van der Spuy, E. Streicher, S.L. Ndabambi, C.R.E. McEvoy, M. Kidd, N. Beyers, T.C. Victor, P.D. van Helden and R.M. Warren.** 2007. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family was associated with an increased ability to spread and cause disease. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 1483-1490.

- 56. Hazbón, M.H., M.B. del Valle, M.I. Guerrero, M. Varma-Basil, I. Filliol, M. Cavatore, R. Colangeli, H. Safi, H. Billman-Jacobe, C. Lavender, J. Fyfe, L. García-García, A. Davidow, M. Brimacombe, C.I. León, T. Porras, M. Bose, F. Chaves, K.D. Eisenach, J. Sifuentes-Osornio, A.P. de León, M.D. Cave and D. Alland.** 2005. Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3794-3802.
- 57. Hazbón, M.H., M. Brimacombe, M.B. del Valle, M. Cavatore, M.I. Guerrero, M. Varma-Basil, H. Billman-Jacobe, C. Lavender, J. Fyfe, L. García-García, C.I. León, M. Bose, F. Chaves, M. Murray, K.D. Eisenach, J. Sifuentes-Osornio, M.D. Cave, A. Ponce de León and D. Alland.** 2006. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 2640-2649.
- 58. Heep, M., B. Brandstätter, U. Rieger, N. Lehn, E. Richter, S. Rüsç-Gerdes and S. Niemann.** 2001. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin Microbiol.* **39**: 107-110.
- 59. Herrera, L., S. Jiménez, A. Valverde, M.A. García-Aranda and J.A. Sáez-Nieto.** 2003. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996/2001). Description of new mutations in the *rpoB* gene and review of the literature. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **21**: 403-408.
- 60. Herzog, B.H.** 1998. History of tuberculosis. *Respiration.* **65**: 5-15.
- 61. Heym, B. and S.T. Cole.** 1992. Isolation and characterization of isoniazid-resistant mutants of *Mycobacterium smegmatis* and *M. aurum*. *Res. Microbiol.* **143**: 721-30.

- 62. Heym, B., Y. Zhang, S. Poulet, D. Young and S.T. Cole.** 1993. Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **175**: 4255-4259.
- 63. Heym, B., B. Saint-Joanis and S.T. Cole.** 1999. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber. Lung Dis.* **79**: 267-271.
- 64. Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson.** 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat. Biotechnol.* **11**: 1026-1030.
- 65. Holtz, T.** 2007. XDR-TB in South Africa: revised definition. *PLoS Med.* **4**: e161.
- 66. Huitric, E., J. Werngren, P. Juréen and S. Hoffner.** 2006. Resistance levels and *rpoB* gene mutations among in vitro-selected rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 2860-2862.
- 67. Inderlied, C.B. and K.A. Nash.** 1996. Antimycobacterial agents: *in vitro* susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biologic fluids, pp. 127-175. *In* *Antibiotics in laboratory medicine* (4th ed), Victor Lorian, Williams and Wilkins. Baltimore. EUA.
- 68. Iseman, M.D. and L.A. Madsen.** 1991. Chronic tuberculous empyema with bronchopleural fistula resulting in treatment failure and progressive drug resistance. *Chest.* **100**: 124-127.

- 69. Iwamoto, T., S. Yoshida, K. Suzuki and T. Wada.** 2008. Population structure analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 3805-3809.
- 70. Jerkins, C., J. Bacon, J. Allnut, K.A. H.A. Hatch, A. Bose, D.M. O'Sullivan, C. Arnold, S.H. Gillespie and T. McHugh.** 2009. Enhanced heterogeneity of *rpoB* in *Mycobacterium tuberculosis* found at low pH. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**: 1118-1120.
- 71. Jiang, X., W. Zhang, Y. Zhang, F. Gao, C. Lu, X. Zhang and H. Wang.** 2008. Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. *Microb. Drug Resist.* **14**: 7-11.
- 72. Johnson, R., E.M. Streicher, G.E. Louw, R.M. Warren, P.D. van Helden and T.C. Victor.** 2006. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**: 97-112.
- 73. Juréen, P., J. Werngren, J. Toro and S. Hoffner.** 2008. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 1852-1854.
- 74. Kaplan, G., FA. Post, A.L. Moreira, H. Wainwright, B.N. Kreiswirth, M. Tanverdi, B. Mathema, S.V. Ramaswamy, G. Walther, L.M. Steyn, C.E. Barry III and L.G. Bekker.** 2003. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect. Immun.* **71**: 7099-7108.
- 75. Kapur, V., L. Li, S. Iordanescu, M.R. Hamrick, A. Wanger, B.N. Kreiswirth and J.M. Musser.** 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase β

subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. J. Clin. Microbiol. **32**: 1095-1098.

- 76. Karahan, Z.C. and N. Akar.** 2005. Restriction endonuclease analysis as a solution for determining rifampicin resistance mutations by automated DNA sequencing in heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis*. Microb. Drug Resist. **11**: 137-140.
- 77. Kubica, G.P., T.H. Kim and F.P. Dunbar.** 1972. Designation of strain H37Rv as the neotype of *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Syst. Bacteriol. **22**: 99-106.
- 78. Laszlo, A. and S.H. Siddiqi.** 1984. Evaluation of a rapid radiometric differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with p-nitro- α -acetilamino- β -hydroxypropiofenone. J. Clin. Microbiol. **19**: 694-698.
- 79. Lebrun, L., F. Espinasse, J.D. Poveda and V. Vincent-Levy-Frebault.** 1992. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. J. Clin. Microbiol. **30**: 2476-2478.
- 80. Lee, A.S.G., A.S.M. Teo and S. Wong.** 2001. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **45**: 2157-2159.
- 81. Lester, W.** 1972. Rifampicin: a semisynthetic derivative of rifamycin-a prototype for the future. Annu. Rev. Microbiol. **26**: 85-102.
- 82. Levy, S.B.** 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. J. Appl. Microbiol. **92**: 65S-71S.

- 83. Lévy-Frébbault, V.V. and F. Portaels.** 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slow growing *Mycobacterium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 315-323.
- 84. Li, X., L. Zhang and H. Nikaido.** 2004. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2415-2351.
- 85. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods.* **25**: 402-408.
- 86. Louw, G.E., R.M. Warren, N.C.G. van Pittius, C.R.E. McEvoy, P.D. van Helden and T.C. Victor.** 2009. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 3181-3189.
- 87. Luria, S.E. and M. Delbrück.** 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics.* **8**: 491-511.
- 88. Lyle, J.A., P.W. Hammond, W.A. Wiese and N.C. Nelson.** 1989. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin. Chem.* **35**: 1588-1594.
- 89. Marquez, B.** 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie.* **87**: 1137-1147.
- 90. Marrakchi, H., G. Lanéelle and A. Quemard.** 2000. *InhA*, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology.* **146**: 289-296.
- 91. Martinez, J.L. and F. Baquero.** 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1771-1777.

- 92. Martins, M., S. Dastidar, S. Fanning, J. Kristiansen, J. Molnar, J. Pagès, Z. Schelz, G. Spengler, M. Viveiros and L. Amaral.** 2008. Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **31**: 198-208.
- 93. Mdluli, K., R.A. Slayden, Y. Zhu, S. Ramaswamy, X. Pan, D. Mead, D.D. Crane, J.M. Musser and C.E. Barry III.** 1998. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl ACP Synthase by isoniazid. *Science.* **280**: 1607-1610.
- 94. Meacci, F., G. Orru, E. Iona, F. Giannoni, C. Piersimoni, G. Pozzi, L. Fattorini and M.R. Oggioni.** 2005. Drug resistance evolution of a *Mycobacterium tuberculosis* strain from a noncompliant patient. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3114-3120.
- 95. Meier, A., P. Kirschner, F. Bange, U. Vogel and E.C. Böttger.** 1994. Genetic alterations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 228-233.
- 96. Meier, A., P. Sander, K.J. Schaper, M. Scholz and E.C. Böttger.** 1996. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2452-2454.
- 97. Millán, R.S., J. Garaizar and J. Bikandi.** 2005. *In silico* simulation of fingerprinting techniques based on double endonuclease digestion of genomic DNA. *In Silico Biol.* **5**: 31.
- 98. Mitchison, D.A.** 2000. Role of individual drugs in the chemotherapy of tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **4**: 796-806.

- 99. Mizrahi, V. and S.J. Andersen.** 1998. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? *Mol. Microbiol.* **29**: 1331-1339.
- 100. Mostowy, S., J. Inwald, S. Gordon, C. Martin, R. Warren, K. Kremer, D. Cousins and M.A. Behr.** 2005. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *J. Bacteriol.* **187**: 6386-6395.
- 101. Musser, J.M.** 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 496-514.
- 102. NCBI.** 2009. National Center for Biothecnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov. Acedido em Maio, 2009.
- 103. Ng, V.H., J.S. Cox, A.O. Sousa, J.D. MacMicking and J.D. McKinney.** 2004. Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol. Microbiol.* **52**: 1291-1302.
- 104. Niemann, S., D. Harmsen, S. Rüsç-Gerdes and E. Richter.** 2000. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3231-3234.
- 105. Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* **264**: 382-388.
- 106. Nikaido, H.** 2001. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**: 215-223.
- 107. Normark, B.H. and S. Normark.** 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* **252**: 91-106.

- 108. Okamoto, S., A. Tamaru, C. Nakajima, K. Nishimura, Y. Tanaka, S. Tokuyama, Y. Suzuki and K. Ochi.** 2007. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* **63**: 1096-1106.
- 109. Organização Mundial de Saúde.** 1994. TB a global emergency. WHO reports on the TB epidemics. Geneva, World Health Organization, 1994. WHO/TB/94.177.
- 110. Organização Mundial de Saúde.** 1995. The use of essential drugs. WHO technical report series. Geneva, World Health Organization, 1995. WHO/TRS/850.
- 111. Organização Mundial de Saúde.** 1996. Guidelines for the management of drug resistant tuberculosis. Geneva World Health Organization, 1996. WHO/TB/96.210.
- 112. Organização Mundial de Saúde.** 2001. Guidelines for drug susceptibility testing for second-line anti-tuberculosis drugs for dots-plus. Geneva, World Health Organization, 2001. WHO/CDS/TB/2001.288.
- 113. Organização Mundial de Saúde.** 2003. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Geneva, World Health Organization, 2003. WHO/CDS/TB/2003.320.
- 114. Organização Mundial de Saúde.** 2006. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva, World Health Organization, 2006. WHO/HTM/TB/2006.361.
- 115. Organização Mundial de Saúde.** 2009. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. WHO report 2009. Geneva, World Health Organization, 2009. WHO/HTM/TB/2009.411.

- 116. Pasca, M.R., P. Gugliera, E. De Rossi, F. Zara and G. Riccardi.** 2005. *mmpL7* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4775-4777.
- 117. Perdigão, J., R. Macedo, I. Joao, E. Fernandes, L. Brum and I. Portugal.** 2008. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. *Microb. Drug Resist.* **14**: 133-143.
- 118. Perdigão, J., R. Macedo, A. Ribeiro, L. Brum and I. Portugal.** 2009. Genetic characterisation of the ethambutol resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis*: prevalence and significance of *embB306* mutations. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **33**: 334-338.
- 119. Perez, J., R. Garcia, H. Bach, J.H. de Waard, W.R. Jacobs, Jr., Y. Av-Gay, J. Bubis and H.E. Takiff.** 2006. *Mycobacterium tuberculosis* transporter MmpL7 is a potential substrate for kinase PknD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**: 6-12.
- 120. Piatek, A.S., A. Telenti, M.R. Murray, H. El-Hajj, W.R. Jacobs Jr., F.R. Kramer and D. Alland.** 2000. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 103-110.
- 121. Piddock, L.J.V.** 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 382-402.
- 122. Portevin, D., C. de Sousa-D'Auria, C. Houssin, C. Grimaldi, M.C. Mamadou Daffé and C. Guilhot.** 2004. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 314-319.

- 123. Portugal, I., M.J. Covas, L. Brum, M. Viveiros, P. Ferrinho, J. Moniz-Pereira and H. David.** 1999. Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **3**: 207-213.
- 124. Portugal, I., L. Barreiro, J. Moniz-Pereira and L. Brum.** 2004. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2736-2738.
- 125. Rad, M.E., P. Bifani, C. Martin, K. Kremer, S. Samper, J. Rauzier, B. Kreiswirth, J. Blazquez, M. Jouan, D. van Soolingen and B. Gicquel.** 2003. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerging Infect. Dis.* **9**: 838-845.
- 126. Ramaswamy, S. and J.M. Musser.** 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update. *Tuberc. Lung Dis.* **79**: 3-29.
- 127. Ramaswamy, S.V., A.G. Amin, S. Göksel, C.E. Stager, S. Dou, H.E. Sahly, S.L. Moghazeh, B.N. Kreiswirth and J.M. Musser.** 2000. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 326-336.
- 128. Ramaswamy, S.V., R. Reich, S. Dou, L. Jasperse, X. Pan, A. Wanger, T. Quitugua and E.A. Graviss.** 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 1241-1250.
- 129. Ramón-García, S., C. Martín, C.J. Thompson and J.A. Aínsa.** 2009. Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance,

oxidative stress response, and growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 3675-3682.

- 130. Raynaud, C., M. Lanéelle, R.H. Senaratne, P. Draper, G. Lanéelle and M. Daffé.** 1999. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology.* **145**: 1359-1367.
- 131. Reynolds, M.G.** 2000. Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics.* **156**: 1471-1481.
- 132. Richter, E., M. Weizenegger, S. Rüscher-Gerdes and S. Niemann.** 2003. Evaluation of Genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2672-2675.
- 133. Rigouts, L., O. Nolasco, P. de Rijk, E. Nduwamahoro, A. Van Deun, A. Ramsay, J. Arevalo and F. Portaels.** 2007. Newly developed primers for comprehensive amplification of the *rpoB* gene and detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 252-254.
- 134. Rinder, H., K.T. Mieskes and T. Löscher.** 2001. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **5**: 339-345.
- 135. Rossau, R., H. Traore, H. de Beenhouwer, W. Mijs, G. Jannes, P. de Rijk and F. Portaels.** 1997. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2093-2098.
- 136. Rozen, S. and H.J. Skaletsky.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, pp 365-386. *In* S. Krawetz and S. Misener (eds)

Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, NJ.

- 137. Rozwarski, D.A., G.A. Grant, D.H.R. Barton, W.R. Jacobs Jr. and J.C. Sacchettini.** 1998. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. **279**: 98-102.
- 138. Russell, D.G.** 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 39-47.
- 139. Ryan, B.M., T.J. Dougherty, D. Beaulieu, J. Chuang, B.A. Dougherty and J.F. Barrett.** 2001. Efflux in bacteria: what do we really know about it? *Expert Opin. Investig. Drugs* **10**: 1409-1422.
- 140. Sander, P., A. Meier and E.C. Böttger.** 1996. Ribosomal drug resistance in mycobacteria. *Res. Microbiol.* **147**: 59-67.
- 141. Sarin, J., S. Aggarwal, R. Chaba, G.C. Varshney and P.K. Chakraborti.** 2001. β -subunit of phosphate-specific transporter from *Mycobacterium tuberculosis* is a thermostable ATPase. *J. Biol. Chem.* **276**: 44590-44597.
- 142. Scorpio, A. and Y. Zhang.** 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.* **2**: 662-667.
- 143. Sherman, D.R., K. Mdluli, M.J. Hickey, T.M. Arain, S.L. Morris, C.E. Barry III, C. K. Stover.** 1996. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. **272**: 1641-1643.
- 144. Seth, V., S.D. Seth, A. Beotra, O.P. Semwal, V. D'monty and S. Mukhopadhyaya.** 1994. Isoniazid and acetylisoniazid kinetics in serum and urine

in pulmonary primary complex with intermittent regimen. *Indian Pediatr.* **31**: 279-285.

- 145. Siddiqi, S.H.** 1989. BACTEC 460-TB System. Product and procedure manual. Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems. Towson, EUA.
- 146. Siddiqi, N., M. Shamim, S. Hussain, R.K. Choudhary, N. Ahmed, Prachee, S. Banerjee, G.R. Savithri, M. Alam, N. Pathak, A. Amin, M. Hanief, V.M. Katoch, S.K. Sharma and S.E. Hasnain.** 2002. Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in North India. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 443-450.
- 147. Siddiqi, N., R. Das, N. Pathak, S. Banerjee, N. Ahmed, V.M. Katoch and S.E. Hasnain.** 2004. *Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump. *Infection.* **32**:109-111.
- 148. Siddiqi, S. and S. Rüsç-Gerdes.** 2006. MGIT960 Procedure Manual for BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Also applicable for Manual MGIT). Mycobacteria growth indicator tube (MGIT) culture and drug susceptibility demonstration projects. Foundation for innovative new diagnostics Ed. Disponible en: http://www.finddiagnostics.org/news/resources/publications/mgit_manual%20_sept2006.pdf.
- 149. Siddiqi, S., P. Takhar, C. Baldeviano, W. Glover and Y. Zhang.** 2007. Isoniazid induces its own resistance in nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 2100-2104.
- 150. Silva, P.E.A., F. Bigi, M. de la Paz Santangelo, M.I. Romano, C. Martín, A. Cataldi and J.A. Aínsa.** 2001. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 800-804.

- 151. Singh, R., B. Wiseman, T. Deemagarn, L.J. Donald, H.W. Duckworth, X. Carpena, I. Fita and P.C. Loewen.** 2004. Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. *J. Biol. Chem.* **279**: 43098-43106.
- 152. Singh, P., A.K. Mishra, S.K. Malonic, D.S. Chauhan, V.D. Sharma, K. Venkatesan and V.M. Katoch.** 2006. The paradox of pyrazinamide: an update on the molecular mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria. *J. Commun. Dis.* **38**: 288-298.
- 153. Sippel, A.E. and G.R. Hartmann.** 1970. Rifampicin resistance of RNA polymerase in the binary complex with DNA. *Eur. J. Biochem.* **16**: 152-157.
- 154. Slayden, R.A. and C.E. Barry III.** 2000. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* **2**: 659-669.
- 155. Somoskövi, A, J.E. Hotaling, M. Fitzgerald, D. O'Donnell, L.M. Parsons and M. Salfinger.** 2001. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. *Chest.* **120**: 250-257.
- 156. Somoskövi, A., L.M. Parsons and M. Salfinger.** 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir. Res.* **2**:164-168.
- 157. Somoskövi, A., Q. Song, J. Mester, C. Tanner, Y.M. Hale, L.M. Parsons and M. Salfinger.** 2003. Use of molecular methods to identify the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and other mycobacterial species and to detect rifampin resistance in MTBC isolates following growth detection with the BACTEC MGIT 960 system. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2822-2826.
- 158. Spies, F.S., P.E.A. da Silva, M.O. Ribeiro, M.L. Rossetti and A. Zaha.** 2008. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical

isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 2947-2949.

- 159. Springer, B., K. Lucke, R. Calligaris-Maibach, C. Ritter and E.C. Böttger.** 2009. Quantitative drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using MGIT960 and the EpiCenter instrumentation. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1773-1780.
- 160. Sreevatsan, S., X. Pan, K.E. Stockbauer, D.L. Williams, B.N. Kreiswirth and J.M. Musser.** 1996. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1024-1026.
- 161. Sreevatsan, S., X. Pan, K.E. Stockbauer, N.D. Connell, B.N. Kreiswirth, T.S. Whittam and J.M. Musser.** 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 9869-9874.
- 162. Sreevatsan, S., X. Pan, Y. Zhang, B.N. Kreiswirth and J.M. Musser.** 1997. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 636-640.
- 163. Sreevatsan, S., X. Pan, Y. Zhang, V. Derectic and J.M. Musser.** 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 600-606.
- 164. Srivastava, S., A. Ayyagaria, T.N. Dholea, K.K. Nyatia and S.K. Dwivedi.** 2009. *emb* nucleotide polymorphisms and the role of *embB306* mutations in

Mycobacterium tuberculosis resistance to ethambutol. Int. J. Med. Microbiol. **299**: 269-280.

- 165. Starks, A.M., A. Gumusboga, B.B. Plikaytis, T.M. Shinnick and J.E. Posey.** 2009. Mutations at *embB306* are an important molecular indicator of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. **53**: 1061-1066.
- 166. Sun, Y., A.S.G. Lee, S. Wong and N.I. Paton.** 2007. Analysis of the role of *Mycobacterium tuberculosis kasA* gene mutations in isoniazid resistance. Clin. Microbiol. Infect. **13**: 833-835.
- 167. Takayama, K., L. Wang and H.L. David.** 1972. Effect of isoniazid on the *in vivo* mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. **2**: 29-35.
- 168. Talbot, E.A., D.L. Williams and R. Frothingham.** 1997. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. J. Clin. Microbiol. **35**: 566-569.
- 169. Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, T. Schmidheini and T. Bodmer.** 1993. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. Antimicrob. Agents Chemother. **37**: 2054-2058.
- 170. Telenti, A., W.J. Philipp, S. Sreevatsan, C. Bernasconi, K. E. Stockbauer, B. Wieles, J.M. Musser and W.R. Jacobs.** 1997. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. Nat. Med. **3**: 567-570.
- 171. Tortoli, E.** 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin. Microbiol. Rev. **16**: 319-354.

- 172. Tortoli, E.** 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **48**: 159-178.
- 173. Tufariello, J. M., J. Chan and J.L. Flynn.** 2003. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect. Dis.* **3**: 578-590.
- 174. Ulrichs T. and S.H.E. Kaufmann.** 2002. Mycobacterial persistence and immunity. *Front. Biosci.* **7**: 458-469.
- 175. Ulrichs T. and S.H.E. Kaufmann.** 2006. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J. Pathol.* **208**: 261-269.
- 176. van Doorn, H.R., P.E.W. de Haas, K. Kremer, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, M.W. Borgdorff and D. van Soolingen.** 2006. Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino acid position 315 of *katG*: a decade of experience in The Netherlands. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**: 769-775.
- 177. van Soolingen, D., T. Hoogenboezem, P.E.W. de Haas, P.W.M. Hermans, M.A. Koedam, K.S. Teppema, P.J. Brennan, G.S. Besra, F. Portaels, J. Top, L.M. Schouls and J.D.A. van Embden.** 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 1236-1245.
- 178. van Soolingen, D., P.E.W. de Haas, H.R van Doorn, E. Kuijper, H. Rinder and M.W. Borgdorff.** 2000. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in The Netherlands. *J. Infect. Dis.* **182**: 1788-1790.

- 179. Vijdea, R., M. Stegger, A. Sosnovskaja, Å. B. Andersen, V.Ø. Thomsen and D. Bang.** 2008. Multidrug-resistant tuberculosis: rapid detection of resistance to rifampin and high or low levels of isoniazid in clinical specimens and isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**: 1079-1086.
- 180. Vilchèze C. and W.R. Jacobs, Jr.** 2007. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 35-50.
- 181. Viveiros, M., I. Portugal, R. Bettencourt, T.C. Victor, A.M. Jordaan, C. Leandro, D. Ordway and L. Amaral.** 2002. Isoniazid-induced transient high-level resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2804-2810.
- 182. Viveiros, M., C. Leandro and L. Amaral.** 2003. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**: 274-278.
- 183. Viveiros, M., C. Leandro, L. Rodrigues, J. Almeida, R. Bettencourt, I. Couto, L. Carrilho, J. Diogo, A. Fonseca, L. Lito, J. Lopes, T. Pacheco, M. Pessanha, J. Quirim, L. Sancho, M. Salfinger and L. Amaral.** 2005. Direct application of the INNO-LiPA Rif.TB line-probe assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains and detection of rifampin resistance in 360 smear-positive respiratory specimens from an area of high incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 4880-4884.
- 184. Viveiros, M., A. Jesus, M. Brito, C. Leandro, M. Martins, D. Ordway, A.M. Molnar, J. Molnar and L. Amaral.** 2005. Inducement and reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* K-12 and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3578-3582.

- 185. Viveiros, M., M. Dupont, L. Rodrigues, I. Couto, A. Davin-Regli, M. Martins, J. Pagès and L. Amaral.** 2007. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS ONE* **2**: e365.
- 186. Wayne, L.G.** 1994. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 908-914.
- 187. Webber, M.A. and L.J. Piddock.** 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**: 9-11.
- 188. Wengenack, N.L., M.P. Jensen, F. Rusnak and M.K. Stern.** 1999. *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a peroxy-nitritase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**: 485-487.
- 189. Werngren, J. and S.E. Hoffner.** 2003. Drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate. *J. Clin Microbiol.* **41**: 1520-1524.
- 190. Wilson, M., J. DeRisi, H.H., Kristensen, P. Imboden, S. Rane, P.O. Brown and G. K. Schoolnik.** 1999. Exploring drug induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 12833-12838.
- 191. Yang, B., H. Koga, H. Ohno, K. Ogawa, M. Fukuda, Y. Hirakata, S. Maesaki, K. Tomono, T. Tashiro and S. Kohn.** 1998. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**: 621-628.
- 192. Zhang, Y., B. Heym, B. Allen, D. Young and S. Cole.** 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature.* **358**: 591-593.

- 193. Zhang, Y., T. Garbe and D. Young.** 1993. Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. *Mol. Microbiol.* **8**: 521-524.
- 194. Zhang, Y. and D. Young.** 1994. Strain variation in the *katG* region of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **14**: 301-308.
- 195. Zhang, Y., A. Scorpio, H. Nikaido and Z. Sun.** 1999. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Bacteriol.* **181**: 2044-2049.
- 196. Zhang, G., E.A. Campbell, L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov and S.A. Darst.** 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell.* **98**: 811-824.
- 197. Zhang, Y., S. Permar and Z. Sun.** 2002. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Med. Microbiol.* **51**: 42-49.
- 198. Zhang, Y. and D. Mitchison.** 2003. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **7**: 6-21.
- 199. Zhang, S., H. Qi, D. Qiu, D. Li, J. Zhang, C. Du, G. Wang, Z. Yang and Q. Sun.** 2007. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Central China. *Biochem. Genet.* **45**: 281-290.
- 200. Zimhony, O., J.S. Cox, J.T. Welch, C. Vilchèze and W.R. Jacobs, Jr.** 2000. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature.* **6**: 1043-1047.

- 201. Zuber, B., M. Chami, C. Houssin, J. Dubochet, G. Griffiths and M. Daffé.**
2008. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J. Bacteriol.* **190**: 5672-5680.