UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Construção do fago recombinante D29::*gfp* com potencial de aplicação nos testes de sensibilidade pela concentração inibitória mínima para o *Mycobacterium* spp.

Paulo Henrique Lage Carbone

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2007

18.924

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013024

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Carbone, Paulo Henrique Lage

C264c Construção do fago recombinante D::29gfp com potencial de aplicação nos testes de sensibilidade pela concentração inibitória mínima para o *Mycobacterium sp.* / Paulo Henrique Lage Carbone. -- São Paulo, 2007.
120p.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Diagnóstico laboratorial : Medicina 2. Quimioterapia : Tuberculose 3. *Mycobacterium* : Bacteriologia I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

616.0756-9 CDD

Paulo Henrique Lage Carbone

Construção do fago recombinante D29::*gfp* com potencial de aplicação nos testes de sensibilidade pela concentração inibitória mínima para o *Mycobacterium* spp.

Comissão Julgadora da Tese
para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador / presidente

Prof. Dr. Fernando Augusto Fiúza de Melo
1º examinador

Dra. Daisy Nakamura Sato
2º examinador

Profa Dra Clarice Queico Fujimura Leite
3º examinador

Profa Dra Rosilene Fressatti Cardoso
4º examinador

São Paulo, 29 de Junho de 2007.

Este trabalho foi realizado:

- Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico e Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP);
- Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista em Araraquara (FCF-UNESP);
- Laboratório de Micobactérias do Instituto Clemente Ferreira em São Paulo.

Apoio Financeiro:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo # 04/08405-0.

Bolsa Doutorado CAPES.

Para ser humano não preciso exigir de mim o que seria próprio dos deuses, mas prestar atenção nos outros e abrir-lhes espaço, admitir o mistério de tudo, respeitar a vida, tolerar minhas fraquezas, aproveitar meus talentos e procurar o dom da alegria - que é fundamental.

Pois alienação é também cultivar a amargura e ignorar que a vida pode ser boa, o amor positivo, o ser humano comovente e o significado de tudo acessível ao coração e ao sonho.

Se não posso corrigir os males do mundo, da minha reduzida condição pessoal, posso ao menos não colaborar para que ele se torne mais violento, mais mesquinho e mais cruel.

Dedico essa Tese a Benedita Pereira

Se eu posso me sentir orgulhoso e privilegiado por algum motivo, além de ter tido pais amorosos e amigos, foi ter sido criado pela Dita.

Ela foi muito mais que uma mãe substituta, foi e tem sido uma grande inspiração e o exemplo vivo do amor incondicional.

Não saberia expressar toda a minha gratidão, respeito e admiração.

Só posso, nesse momento, agradecer por toda essa dedicação a mim e a todos da nossa família.

Que todo o bem que você fez e continua fazendo seja revertido a você em saúde e alegria e que a nós seja permitido conviver e usufruir da sua companhia por muito mais tempo.

Aos meus pais, José Carbone Filho e Neusa Lage Carbone, que mesmo não estando presentes em corpo físico, estiveram ajudando-me, acolhendo-me e estimulando-me a ser um pouco melhor a cada dia.

Minha querida, Neusa Maria Carbone Aires, porto-seguro, companheira e mais que irmã, uma grande amiga.

Agradecimentos

Ao orientador Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata o meu muito obrigado por ter recebido-me no seu laboratório e ter permitido que eu aprendesse muito. A convivência foi uma experiência bastante enriquecedora, tanto pelo aspecto profissional como o pessoal e fico muito grato por ter tido a oportunidade de presenciar em você exemplos de determinação, competência e entusiasmo ao trabalho.

À Profa Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata agradeço pelas sugestões, auxílios técnicos, conselhos e demonstração de competência.

À Profa Dra. Elsa Masae Mamizuka agradeço pela constante atenção e por ter disponibilizado os reagentes e aparelhos do Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À toda a equipe do Instituto Clemente Ferreira pela acolhida e ajuda, mas principalmente a Maria Idemar P. Albarral que se comprometeu e foi uma ajuda fundamental na execução da parte experimental. Meus eternos agradecimentos e amizade.

À toda equipe do Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista em Araraquara (FCF-UNESP) e em especial ao Dr. José Rodrigues C. Pandolfi pela realização dos testes de identificação e caracterização molecular, mas sobretudo pela constante dedicação e atenção demonstradas no decorrer do trabalho.

À Profa Dra. Clarice Queico Fujimura Leite do Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista em Araraquara (FCF-UNESP) pela coordenação dos trabalhos realizados em seu laboratório e pelo carinho e amizade.

À Pesquisadora Científica Dra. Daisy Nakamura Sato do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto pelo treinamento da técnica REMA, sugestões apresentadas no exame de qualificação e por ser essa pessoa tão generosa e incentivadora.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Fiúza de Melo, Diretor do Instituto Clemente Ferreira, pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação e agradeço principalmente por todas as palavras de estímulo e amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome da sua Diretora, Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu Chefe, Profa. Tit. Dulcinéia Saes Parra Abdalla.

À Profa Tit. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Às funcionárias da Secretaria do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Sueli Providelo, Ana Maria Dias Dantas, Maria Auxiliadora de Lima e Edna Batista Lima pelo auxílio profissional e amizade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Farmácia: Elaine Midory Ychico e Jorge Alves Lima pelo carinho e auxílio profissional.

À bibliotecária de referência Leila Aparecida Bonadio da Biblioteca do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo pela correção das Referências Bibliográficas e pela constante atenção dispensada a todos.

Muitos amigos e colegas que me acompanharam no Laboratório de Biologia Molecular estiveram envolvidos de alguma forma neste trabalho, seja diretamente, ou somente com palavras de incentivo. Gostaria de poder citar a todos aqui, mas para não cometer a injustiça de esquecer algum nome, optei em omitir essa lista. Contudo tenho a consciência de que em algum momento passado eu deixei demonstrado o meu respeito, a minha amizade e a minha gratidão a cada um e digo ainda mais – foi um prazer imenso conviver com vocês.

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Quadros e Tabelas	v
Resumo	vii
Summary	ix
1 - Introdução	1
2 - Objetivos	24
3 - Material e Métodos	25
3.1 - Amostras micobacterianas	25
3.1.1 – Cultura das amostras clínicas	25
3.1.2 – Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	25
3.2 - Determinação da CIM empregando o REMA	26
3.2.1 - Preparo das suspensões micobacterianas	27
3.2.2 - Preparo das soluções dos fármacos para a realização do REMA	28
3.2.3 - Esquema das microplacas utilizadas no REMA	29
3.3 – Identificação e caracterização molecular dos isolados clínicos de <i>Mycobacterium spp</i>	32
3.3.1 - Extração do DNA genômico por termólise	32
3.3.2 - Avaliação eletroforética do DNA genômico	33
3.3.3 - Quantificação e análise do DNA genômico	34
3.3.4 – Identificação molecular pela PCR IS6110	34
3.3.5 – Identificação molecular pelo PRA gene <i>hsp65</i>	35

3.3.5.1 - Digestão do fragmento <i>hsp65</i> amplificado pelo PRA	36
3.3.6 - Caracterização molecular pelo MIRU	37
3.4 - Experimentos com o fago D29	38
3.4.1 - Propagação do fago D29 em meio líquido	38
3.4.2 - Titulação do fago D29 em meio agar (TSA)	39
3.4.3 - Extração do DNA do fago D29	39
3.4.4 - Extração de DNA pelo kit da Promega	40
3.4.5. - Identificação do sítio de restrição no DNA do fago D29	41
3.4.6 - Digestão do DNA do fago D29 pela enzima <i>Spe I</i>	42
3.4.7 - Eletroforese em campo pulsado	43
3.5 – Expansão do plasmídeo pYL GFP	44
3.5.1 - Produção de <i>E. coli</i> competentes	45
3.5.2 - Transformação das <i>E. coli</i> competentes	45
3.5.3 - Produção do fragmento <i>hsp70-gfp</i> pela PCR	46
3.5.4 - Digestão do fragmento <i>hsp70-gfp</i> pela <i>Spe I</i>	47
3.6 - Construção do fago recombinante D29:: <i>gfp</i>	48
3.6.1 - Reação de ligação dos fragmentos fago D29 com a <i>hsp70-gfp</i>	48
3.6.2 – Teste de sensibilidade a antibióticos utilizando o fago D29:: <i>gfp</i>	49
4– Resultados	51
4.1 – Amostras micobacterianas	51
4.2 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos	52
4.2.1 – Curva ROC obtidas a partir do programa R	54
4.3 – Identificação e caracterização molecular dos isolados de <i>M.spp</i>	57
4.3.1 – Extração do DNA das micobactérias pela termólise	57

4.4 – Resultados da identificação e caracterização molecular dos isolados clínicos	58
4.4.1 – Identificação e caracterização molecular do <i>M.tuberculosis</i> pela PCR IS6110	58
4.4.2 – Identificação molecular pelo PRA <i>hsp65</i>	59
4.4.3 – Caracterização molecular dos isolados de <i>M.tuberculosis</i> pela técnica de MIRU	61
4.5 – Experimentos com fago D29	65
4.5.1 – Expansão do fago D29 em meio líquido	65
4.6 – Extração do DNA do fago D29	66
4.6.1 – Reação de digestão do DNA do fago D29 pela <i>Spe I</i>	67
4.6.2 - Eletroforese em campo pulsado	68
4.7 – Produção do fragmento <i>hsp70-gfp</i> pela PCR	72
4.7.1 – Digestão enzimática do fragmento <i>hsp70-gfp</i> pela <i>Spe I</i>	73
4.8 - Reação de ligação dos fragmentos correspondentes aos DNAs do fago D29 com <i>hsp70-gfp</i>	73
4.8.1 - Expansão do fago D29 em <i>M. smegmatis</i> após a reação de encapsulamento empregando os extratos fornecidos pela Packagene® e Gigapack®	74
4.9 - Determinação da CIM empregando o D29:: <i>gfp</i> como agente revelador	75
5 – Discussão	76
6 – Conclusões	88
7 – Referências Bibliográficas	89
Anexos	109

Lista de Abreviaturas

AMTD	“amplified mycobacterium tuberculosis direct test”
BCG	bacilo de Calmett-Guerin
BSA	albumina de soro bovino
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CDC	“Center for Diseases Control and Prevention”, Atlanta, EUA
CIM	concentração inibitória mínima
CO ₂	dióxido de carbono
D29::Luc	fago (D29) recombinante com hsp60 e gene da luciferase
dNTPs	desoxinucleotídeo trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
E	etambutol
Et	etionamida
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
g	grama
GFP	proteína verde fluorescente
<i>gfp</i>	gene que codifica a proteína verde fluorescente
HCl	ácido clorídrico
HIV	vírus da imunodeficiência adquirida
Hsp 70	“heat shocking protein 70 KDa”
IL	Inter leucinas
H	isoniazida
IFN-G	interferon gama
<i>InhA</i>	gene que codifica a enoi-ACP redutase
ICF	Instituto Clemente Ferreira
<i>KasA</i>	gene que codifica a B-cetoacetil ACP sintase
Kb	quilo pares de bases nitrogenadas
<i>KatG</i>	gene que codifica a catalase-peroxidase
LAM	lipoarabinomanana
L-J	meio de cultura Lowenstein-Jensen
L5::FFlux	fago (L5) recombinante com o gene da luciferase
LB	meio de cultura Luria Bertani
MABA	“microplate alamar blue assay”
mg	miligrama
min	minuto
MGIT	“mycobacteria growth indicator tube”
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
MDR-TB	tuberculose multi-droga resistente
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
MIRU	“mycobacterial interspersed repetitive units”
mL	mililitro
mM	milimolar
N	normal
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
OADC	ácido oléico, albumina, dextrose e catalase

OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	"open reading frame"
PAST	paleontological statistics software package for education and data analysis
pb	pares de bases nitrogenadas
PCR	"polymerase chain reaction"
PFGE	"pulsed field gel electrophoresis"
PhaB	"phage amplified biologically assay"
pH	potencial hidrogeniônico
PRA	"PCR-restriction enzyme analysis"
Z	pirazinamida
REMA	"resazurin microtiter assay plate"
RFLP	"restriction fragment length polymorphism"
r	resistente
R	rifampicina
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _r	RNA ribossômico
RNA _t	RNA transportador
<i>rpo</i> β	gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase micobacteriana
<i>rpsL</i>	gene que codifica a proteína ribossomal 12 S da micobactéria
<i>rrs</i>	gene que codifica a subunidade 16S do RNA _r da micobactéria
RT-PCR	"reverse transcriptase - polymerase chain reaction"
s	sensível
SDS	dodecil sulfato de sódio
S	estreptomicina
TBE	tampão TRIS-borato-EDTA
TE	tampão TRIS-EDTA
TSA	"tryptic soy agar"
TSB	"tryptic soy broth"
UV	ultra violeta
V/cm	volts por centímetro
VNTR	"variable numbers of tandem repeats"

Lista de Figuras

Figura 1 - Características ultraestruturais do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
Figura 2 - Microscopia eletrônica do fago D29	14
Figura 3 - Fago D29 infectando o <i>M.ulcerans</i> 1615	14
Figura 4 - Organização genética dos fagos D29 e L5	16
Figura 5 - Representação esquemática e ilustrativa do ensaio PhaB	19
Figura 6 – Esquema das microplacas no método REMA	31
Figura 7 - Representação esquemática do pYL GFP	44
Figuras 8 – Fotografia de uma placa com 96 orifícios representando a CIM pelo método REMA após resazurina	51
Figura 9 - Perfil eletroforético dos DNAs de <i>Mycobacterium</i> spp obtidos pelo método da termólise	57
Figura 10 - Perfil eletroforético de produto de PCR correspondente a sequência de inserção IS6110	58
Figura 11 - Perfis eletroforéticos da digestão dos produtos <i>hsp65</i> (430 pb) digeridos pelas enzimas <i>BsTE</i> II e <i>Hae</i> III	59
Figura 12 - Perfis eletroforéticos do MIRU 2 das amostras de DNA de <i>M.tuberculosis</i> em gel de agarose a 2%.	61
Figura 13 – Dendrograma obtido após análise dos dados do MIRU das amostras de DNA de <i>M.tuberculosis</i>	64
Figura 14 – Fotografia das placas de petri da titulação do fago D29	66
Figura 15 – Perfil eletroforético do DNA do fago D29	67

Figura 16 - Perfis eletroforéticos do DNA do fago D29 digerido pela <i>Spe I</i> em diferentes protocolos de digestão enzimática	68
Figura 17 – Perfis eletroforéticos em campo pulsado do DNA do fago D29 digerido pela <i>Spe I</i>	69
Figura 18 - Perfis eletroforéticos em campo pulsado do DNA do fago D29 digerido pela <i>Spe I</i>	69
Figura 19 – Perfis eletroforéticos dos fragmentos do DNA do fago D29 purificados pelo Kit GFX PCR DNA	70
Figura 20 – Perfil eletroforético do fragmento 845 pb do DNA do fago D29	71
Figura 21 – Perfis eletroforéticos dos produtos de PCR correspondentes às regiões que flanqueiam o promotor <i>hsp70-gfp</i> inseridos p YL GFP	72
Figura 22 – Perfis eletroforéticos dos produtos de digestão dos fragmentos de DNA do <i>hsp70-gfp</i>	73
Figura 23 – Padrão de fluorescência da solução de <i>M. smegmatis</i> antes e após a transfecção com fago D29:: <i>gfp</i>	74
Figura 24 – Placa de microdiluição com 96 orifícios montadas de acordo com o protocolo do REMA empregando o fago D29:: <i>gfp</i> como agente revelador	75

Lista de Quadros

Quadro 1 - Esquemas medicamentosos para o tratamento da tuberculose adotados segundo a forma clínica da doença	5
Quadro 2 - Esquema I (Básico) - Indicado nos casos novos de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar	6
Quadro 3 - Esquema II - Indicado para a forma meningoencefálica	6
Quadro 4 - Esquema III - Indicado nos casos de falência de tratamento com esquemas I e IR	6
Quadro 6 – Resultados dos testes de sensibilidade a antimicobacterianos pelos métodos das proporções e REMA de isolados clínicos de <i>não M.tuberculosis</i> identificados pelo PRAhsp65	60
Quadro 7 – Perfis de MIRU de isolados clínicos de <i>M.tuberculosis</i> com amplificação para os 12 loci	62
Quadro 8 - Perfis de MIRU de cepas de <i>M. tuberculosis</i> com amplificação de 11 loci	65
Quadro 9 – Resultados referentes às densidades óticas (D.O) dos DNAs correspondentes aos fragmentos do fago D29 purificados com kit GFX PCR DNA	71

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Freqüência de valores de CIM para os antimicobacterianos dos isolados clínicos pelo REMA	53
Tabela 2 – Resultados comparativos do teste de sensibilidade pelos métodos das proporções e REMA	53
Tabela 3 – Distribuição relativa das 12 espécies micobacterianas identificadas no PRA <i>hsp65</i>	59
Anexo 1 - Quadro 5 - Resultados do teste de sensibilidade para os 88 isolados clínicos de <i>M.tuberculosis</i> comparando os métodos das proporções com REMA	108

Resumo

O objetivo desse trabalho foi construir o fago recombinante D29::*gfp* e testar a sua utilização como um agente revelador da viabilidade bacilar na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos principais fármacos administrados no tratamento da tuberculose. O fago recombinante contém o promotor *hsp70* e o gene da proteína verde fluorescente (*gfp*) e foi construído através da restrição pela *Spe I* em uma região intergênica próxima a extremidade coesiva direita no genoma do fago D29. O promotor *hsp70* e *gfp* clonados no pYL GFP foram amplificados pela PCR utilizando iniciadores com sítios para *Spe I*. O DNA do fago D29 digerido pela *Spe I* foi ligado com o fragmento *hsp70-gfp* empregando a T4 DNA ligase e os produtos da reação de ligação foram transformados de acordo com o protocolo de encapsulamento. A infecção do *M. smegmatis* com esse fago recombinante induziu a expressão da proteína verde fluorescente (GFP). Para avaliar o uso do fago recombinante em teste de sensibilidade aos fármacos anti-tuberculose, 100 isolados clínicos foram testados quanto ao perfil de sensibilidade a isoniazida (H), rifampicina (R), estreptomicina (S) e etambutol (E), utilizando o método das proporções em Lowenstein-Jensen (L-J), técnica em microplaca com a resazurina (REMA) e técnica em microplaca com D29::*gfp*. Os resultados do REMA demonstraram que 30 isolados clínicos foram sensíveis à H e 58 (66 %) isolados clínicos foram resistentes, dentre os quais a CIM foi 1 µg/mL ou maior para 41 (71%). A CIM da R para 49 (56%) dos isolados clínicos resistentes foi de 0,5 µg/mL para 17 (35%).

A CIM da S para 33 (37%) dos isolados clínicos resistentes foi de 2 µg/mL para 13 (40%) e CIM do E para 34 (39%) dos isolados clínicos resistentes foi de 16 µg/mL ou maior para 19 (56%). A caracterização molecular pela PCR IS6110 identificou 88 isolados clínicos como *M.tuberculosis* e pelo PRA *hsp65*, sete isolados clínicos foram *M. kansasii*, quatro foram *M.abscessus* e um *M.szulgai*. Após empregar o fago recombinante como um agente indicador da viabilidade bacilar para testar a atividade dos fármacos anti-tuberculose conclui-se que a expressão da proteína verde fluorescente foi inespecífica e não reprodutiva, não justificando o seu uso para determinar a CIM para os principais fármacos administrados no tratamento da tuberculose.

Palavras-chaves – *Mycobacterium tuberculosis*, bacteriófago recombinante, concentração inibitória mínima e proteína verde fluorescente.

Summary

The objective of this work was to construct the recombinant phage D29::*gfp* and to use this phage as an indicator agent of cell viability in a minimal inhibitory concentration (MIC) assay for the main drugs used for tuberculosis treatment. The recombinant phage contains the mycobacteria-specific hsp70 promoter controlling the green fluorescent protein gene (*gfp*) and was constructed by *Spe* I restriction in the intergenic region next to the right cohesive termini of the D29 phage genome. An hsp70 promoter and *gfp* previously cloned in pYL GFP was amplified by PCR using primers with *Spe* I sites. The *Spe* I-restricted D29 phage DNA was ligated with the hsp70-*gfp* fragment using T4 DNA ligase and ligated product was transformed using the packing protocol. Infection of *M. smegmatis* with this recombinant phage indicated the expression of green fluorescent protein (GFP). To use the recombinant phage for assaying the activity of anti-TB drugs, 100 clinical isolates were tested for susceptibility to isoniazid (H), rifampicin (R), streptomycin (S), and ethambutol (E) using both the proportion method on Lowenstein-Jensen (L-J) medium, resazurin microtiter assay plate (REMA), as well as a microplate assay using D29::*gfp*. The REMA plate method showed that 30 clinical isolates were susceptible to H and 58 (66%) clinical isolates were resistant, where the MICs were 1 µg/mL or higher for 41 (71%). The R MICs for 49 (56%) resistant clinical isolates were 0,5 µg/mL for 17 (35%). The S MICs for 33 (37%) resistant clinical isolates were 2 µg/mL for 13 (40%) and E MICs for 34 (39%) resistant clinical isolates were 16 µg/mL or higher for 19 (56%). Molecular characterization by PCR IS6110

showed that 88 clinical isolates were *M.tuberculosis* and by PRA *hsp65* were seven clinical isolates were *M.kansasii* and four was *M.abscessus*, and one *M.zulgai*. After using the recombinant phage as an indicator agent of cell viability for assaying the activity of anti-TB drugs we can conclude that the expression of green fluorescent protein was non-specific and not reproducible, rendering it not useful for the determination of the MIC of the principal drugs used for the treatment of tb.

Keywords – *Mycobacterium tuberculosis*, recombinant phage, minimal inhibitory concentration and green fluorescent protein.

INTRODUÇÃO

Introdução

A tuberculose pulmonar é uma infecção bacteriana grave que precisa ser diagnosticada e tratada com um esquema medicamentoso específico. Os fármacos devem ser utilizados pelo tempo suficiente para evitar a persistência bacteriana e promover a cura do paciente.

De acordo com o Comitê Técnico-Científico de Assessoramento à Tuberculose da OMS (Organização Mundial da Saúde), um terço da população mundial está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, e baseada na sua alta incidência, essa infecção é um problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento e é considerada a doença infecto-contagiosa de maior mortalidade isoladamente (RAVIGLIONE *et al.*, 1995 e WHO, 2007). O aumento da notificação dos casos de tuberculose multi-droga resistente (MDR-TB) em associação à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem modificado a epidemiologia e dificultado o controle da tuberculose (WALLIS *et al.*, 1993; COHEN *et al.*; 2003; CORBETT *et al.*; 2003 e COKER, 2004).

O Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo, apresentando 70% de índice de cura dos casos tratados e cerca de 12% de abandono do tratamento (BRASIL, 2004).

As micobactérias pertencem à família *Mycobacteriaceae*, sub-ordem *Corynebacteriaceae*, ordem *Actinomycetales* (SHINNICK & GOOD, 1994). O gênero *Mycobacterium* apresenta atualmente 157 espécies identificadas, incluindo sub-espécie (www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_genus+MYCOBACTERIUM).

O principal agente etiológico da tuberculose pulmonar, o *Mycobacterium tuberculosis* foi identificado por Robert Kock em 1882 e pertence ao complexo *M. tuberculosis* em associação com a *M.bovis*, *M.microti*, *M.africanum*, *M.canetti*, *M.caprae* e *M.pinnipedi* (SOOLINGEN *et al.*, 1997; PFYFFER *et al.*, 1998; ARANAZ *et al.*, 1999 e COUSINS *et al.*, 2003). O complexo *M.tuberculosis* agrupa os microrganismos responsáveis pela formação de tubérculos e necrose caseosa em tecidos.

As micobactérias são classificadas morfologicamente como bacilos finos e retos (0,2 – 0,6 μm de largura por 1 – 10 μm de comprimento), aeróbias estritas, imóveis e não formadora de esporos (YOUMANS, 1979).

Figura 1 – Características ultraestruturais do *Mycobacterium tuberculosis* – cepa H37Rv – aumento de 100.000x (CRISPEN, 1967).

A parede celular das micobactérias é constituída principalmente pelos ácidos micólicos que promovem uma barreira hidrofóbica, conferindo resistência à descoloração por álcool-ácido, aos diversos agentes químicos e antibióticos. A propriedade álcool-ácido resistente da parede possibilita a formação de complexos coloridos com os compostos derivados do trifenilmetano (fucsina e auramina) em decorrência da grande quantidade de lipídeos presentes (KOLATTUKUDY *et al.*, 1997 e YUAN *et al.*, 1998).

A transmissão do *M.tuberculosis* ocorre quando indivíduos com a forma pulmonar da tuberculose eliminam os bacilos para o exterior através da tosse e do espirro. Esses bacilos mantêm-se viáveis por algum tempo em suspensão, na poeira doméstica e podem ser fonte de infecção para indivíduos saudáveis através da inalação dos mesmos. Portanto a principal via de infecção é a respiratória, através da qual os bacilos alcançam os alvéolos pulmonares e se instalam. A partir desse momento, surge um foco inicial nos pulmões que pode tornar-se assintomático em 90% dos indivíduos infectados, induzindo a um estado de latência ou regressão do foco primário e, às vezes, cura espontânea da lesão. Aproximadamente 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a doença em qualquer época da vida em decorrência a uma queda da resistência imunológica (FIÚZA DE MELO & AFIUNE, 1993 e COLSTON & COX, 1999). Os macrófagos alveolares são as primeiras células do sistema imune inato que interagem com os bacilos pelo processo da fagocitose, no entanto o bacilo desenvolve meios apropriados para se proteger desse sistema de defesa. A lipoarabinomanana (LAM), uma glicoproteína de superfície na parede celular da micobactéria, interage com os receptores de manose nos macrófagos e inibe os compostos intermediários de formas reativas do oxigênio, diminuindo a produção de citocinas inflamatórias. GONG *et al.*, 1996, caracterizaram o mecanismo de inibição da resposta Th1 pela interleucina 10 (IL-10) nos patógenos intracelulares através da interação entre a IL-10 e a produção de interferon gama (IFN- γ) em pacientes infectados pelo *M.tuberculosis*.

Esse mecanismo de entrada do *M.tuberculosis* nos macrófagos permite uma desativação inicial do sistema microbicida dessas células, principalmente a diminuição de radicais tóxicos do oxigênio, dando tempo suficiente para que o bacilo se adapte no interior celular e comece a se multiplicar. Embora a fagocitose aconteça sem maiores problemas e um grande contingente das micobactérias seja destruído, uma parte permanece viva e se multiplica dentro dos fagossomas do macrófago, no seu citoplasma ou eventualmente livres

nas cavidades alveolares. Outras vias de transmissão da micobactéria são incomuns, porém não podem ser desconsideradas e entre esses mecanismos de infecção estão: a via congênita, ferimentos ou através do contato sexual. ANGUS *et al.*, 2001 empregaram a técnica de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) da sequência de inserção IS6110 e comprovou utilizando a genotipagem que a infecção peniana no marido e a tuberculose endometrial na respectiva esposa correspondia a mesma cepa do *M.tuberculosis*, e que portanto, a via de transmissão era a sexual.

A produção de fármacos específicos para o *M.tuberculosis* teve início na década de 40, mas foi a partir de 1944 que esses fármacos foram produzidos e administrados em regime de combinações medicamentosas, possibilitando dessa forma uma redução expressiva da doença. Contudo, a incidência da tuberculose aumentou muito na última década, devido ao surgimento de cepas MDR-TB e pela co-infecção tuberculose e HIV (FISCHL *et al.*, 1992, SNIDER *et al.*, 1994; VAN RIE *et al.*, 2000). Os fármacos para o tratamento da tuberculose são administrados em associações específicas, cujo objetivo é impedir que mutantes a apenas um fármaco não se proliferem, evitando assim, a disseminação de bacilos resistentes. As mutações cromossômicas são espontâneas e constantes, não sendo afetadas pelo uso do medicamento, pois estes não induzem mutação e nem ao aparecimento de micobactérias resistentes.

No Brasil, o conceito de MDR-TB refere-se a resistência *in vitro* a rifampicina (R) e isoniazida (H) e a mais um ou mais dos medicamentos componentes dos esquemas I, IR e III ou resistência a R e H e falência operacional ao esquema III, preconizado pelo Programa Nacional de Controle da tuberculose (FIÚZA de MELO *et al.*, 2003).

Na população brasileira, essas resistências aos fármacos antituberculose estão relacionadas ao uso irregular da medicação, a alta taxa de abandono do tratamento de

muitos pacientes ainda com a doença ativa e também pelas prescrições inadequadas. A resistência primária surge quando as cepas de resistência adquirida são transmitidas às outras pessoas. Um estudo foi desenvolvido em um Centro de Referência na cidade de São Paulo para avaliar as taxas de resistência aos fármacos entre as décadas de 60 a 90 e foi verificado um aumento na taxa total de 7,4% na década de 80 e de 17,1% na década de 90, valores esses comparáveis aos obtidos na década de 60 (FIÚZA de MELO *et al.*, 2000).

O paciente com tuberculose, geralmente é submetido a uma terapia inicial intensiva, denominada fase de ataque. Nesse período de dois meses, recomenda-se o uso combinado de três fármacos: R, H e pirazinamida (Z). Na segunda etapa, denominada fase de manutenção com duração de quatro meses, recomenda-se a associação de R e H. Esses esquemas terapêuticos foram preconizados visando eliminar os bacilos nas suas diferentes fases de multiplicação no processo de desenvolvimento da doença. A R e Z atuam bem sobre os bacilos internalizados nos macrófagos, pois difundem-se no meio intracelular e atuam em pH ácido. A R age mais rapidamente em lesões fechadas e caseosas do que a H (MITCHISON, 1979).

Quadro 1 - Esquemas medicamentosos para o tratamento da tuberculose adotados segundo a forma clínica da doença.

Situação clínica	Esquema indicado
Virgem de tratamento	Esquema I
Com tratamento anterior: - Recidiva após cura com o esquema I - Retorno após abandono do esquema I	Esquema I R (reforçado)
Tuberculose meningoencefálica	Esquema II
Falência dos esquemas I ou IR	Esquema III

Quadro 2 - Esquema I (Básico)- 2 RHZ / 4 RH. Indicado nos casos novos de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar

Fase do tratamento	fármacos	Peso do paciente			
		até 20 Kg mg / Kg / dia	20 a 35 Kg mg / dia	35 a 45 Kg mg / dia	mais 45Kg mg / dia
1º fase 2 (meses)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	Z	35	1.000	1.500	2.000
2º fase (4 meses)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400

Siglas: R - rifampicina / H - isoniazida / Z - pirazinamida.

Fonte – BRASIL, 2002.

Quadro 3 - Esquema II – 2 RHZ / 7 RH. Indicado para a forma meningoencefálica da tuberculose.

Fase do tratamento	Fármacos (dose máx)	Peso do paciente			
		até 20 Kg mg / Kg / dia	20 a 35 Kg mg / dia	35 a 45 Kg mg / dia	mais 45Kg mg / dia
1º fase 2 (meses)	R	10 a 20	300	450	600
	(600)				
	H	10 a 20	200	300	400
	(400)				
	Z	35	1.000	1.500	2.000
	(2.000)				
2º fase 7 (meses)	R	10 a 20	300	450	600
	(600)				
	Z	10 a 20	200	300	400
	(400)				

Siglas: R - rifampicina / H - isoniazida / Z - pirazinamida.

Fonte – BRASIL, 2002.

Quadro 4 - Esquema III – 3SZEet / 9 EEt . Indicado nos casos de falência de tratamento com esquemas I e IR.

Fase do tratamento	Fármacos	Peso do paciente			
		até 20 Kg mg / Kg / dia	20 a 35 Kg mg / dia	35 a 45 Kg mg / dia	mais 45Kg mg / dia
1º fase (3 meses)	S	20	500	1.000	1.000
	Z	35	1.000	1.500	2.000
	E	25	600	800	1.200
	Et	12	250	500	750
2º fase (9 meses)	E	25	600	800	1.200
	Et	12	250	500	750

Siglas: S – estreptomicina / Z - pirazinamida / E – etambutol / Et - etionamida

Fonte – MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002.

Com o advento de técnicas em biologia molecular, vários estudos foram conduzidos para identificar as mutações gênicas que possam estar associadas com o aparecimento de resistência em *M. tuberculosis* (TELENTI *et al.*, 1993 a,b; COLE, 1994; MORRIS *et al.*, 1995; MUSSER, 1995; CAWS & DROBNIEWSKI, 2001; SUPPLY *et al.*, 2001; DANELISHVILI *et al.*, 2005; PALOMINO, 2006). Muitos genes já foram avaliados e mostraram seu papel na indução de resistência aos vários fármacos utilizados no tratamento da tuberculose, como por exemplo:

A estreptomicina (S) foi o primeiro fármaco utilizado para o tratamento da tuberculose, mas após três meses de terapia foram descritos os primeiros casos de resistência. A S é um antibiótico glicosídeo aminociclitol que atua unindo-se à subunidade 16S do RNAr inibindo o início da tradução e alterando a síntese protéica. As mutações relacionadas com a resistência a S em *M.tuberculosis* têm sido identificadas nos genes que codificam a subunidade 16S do RNAr (*rrs*) e o gene que codifica a proteína ribossomal 12S (*rpsL*) (FINKEN *et al.*, 1993; NAIR *et al.*, 1993 e HONORE & COLE, 1994).

A isoniazida (H), hidrazida do ácido isonicotínico, foi sintetizada em 1912 e é o mais antigo agente antituberculose sintético. A H inibe a biossíntese de ácido micólico, aumentando a sensibilidade dos bacilos à ação de radicais reativos de oxigênio. Para que a H seja ativada em um intermediário eletrofílico instável, a enzima catalase-peroxidase tem que agir sobre este quimioterápico, e a mutação no gene *KatG* dessa enzima, induz o aparecimento de cepas resistentes (ZHANG *et al.*, 1992; HEYM *et al.*, 1993; COCKERILL *et al.*, 1995; FERRAZOLI *et al.*, 1995). Outro gene relacionado à resistência a H é o *inhA*, que é o codificador da proteína enoyl ACP redutase, catalisadora das primeiras etapas da biossíntese de ácidos micólicos (BANERJEE *et al.*, 1994; ROUSE *et al.*, 1995; MUSSER *et*

al., 1996). Mutação no gene *ahpC*, que codifica uma proteína de 22 KDa denominada alquil-hidroperóxido redutase, parece apresentar atividade análoga às outras peroxidases bacterianas e ser um outro gene responsável pela resistência à H (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 1996 e SHERMAN *et al.*, 1996). CARDOSO, 2003 avaliou as mutações relacionadas à resistência a H e concluiu que, nos isolados clínicos de *M. tuberculosis* de origem brasileira, a maioria das alterações foi observada no gene *KatG*, mas com um pequeno número de isolados também apresentando alterações nos genes da *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC*. Nesse mesmo estudo foram observadas 26 novas mutações no gene *KatG* que ainda não tinham sido descritas e verificaram que as mutações no gene *KasA* foram identificadas tanto em isolados de *M. tuberculosis* resistentes quanto nos sensíveis à H. Todas as cepas bacterianas provenientes de isolados clínicos foram avaliadas genotipicamente pelo método de “spoligotyping” e foram confirmadas como *M. tuberculosis* (CARDOSO *et al.*, 2004).

A rifampicina (R), uma ansamicina lipofílica, inibe a RNA polimerase DNA dependente, impedindo desse modo, a transcrição do RNAm. O mecanismo molecular que induz a resistência à R está presente no gene *rpoβ* que codifica a subunidade beta da RNA polimerase bacteriana. A análise do sequenciamento desse gene apresenta predominância em alterações pontuais, mas também detecção de deleções e inserções na região 81 pares de bases (pb) do gene *rpoβ* (TELENTI *et al.*, 1993a e MILLER *et al.*, 1994). CAMPOS, 2001 avaliou a resistência do *M. tuberculosis* à R e correlacionou com o gene *rpoβ*. Para isso, foi padronizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) em microplacas empregando o fago D29 como revelador do teste e concluiu que houve concordância de 100% dos resultados das cepas resistentes e sensíveis com as demais técnicas empregadas no estudo, “microplate alamar blue assay” (MABA) (FRANZBLAU *et al.*, 1998) e cultura em microplaca (LEITE *et al.*, 2000).

O etambutol (E) é um fármaco que tem a característica de exercer um efeito sinérgico ao aumentar a permeabilidade da parede celular micobacteriana quando administrado com outro fármaco empregado no tratamento da tuberculose. O mecanismo de ação é, provavelmente, a inibição da síntese de arabinogalactano e tem como alvo a arabinosil transferase. As principais mutações estão presentes no gene *embB* e estão associadas com 70% dos isolados clínicos de *M.tuberculosis* resistentes a E (RATTAN *et al.*, 1998).

A pirazinamida (Z), um análogo estrutural da nicotinamida foi testada como fármaco antituberculose em 1952, contudo somente na década de 80 passou a ser administrada na quimioterapia de curta duração para o tratamento da tuberculose (HEIFETS & LINDHOLM-LEVY, 1992). A Z é um pró-fármaco que necessita de ativação através da hidrólise catalisada pela enzima pirazinamidase bacteriana para a síntese do metabólito ativo, o ácido pirazinóico. O gene que codifica a pirazinamidase é o *pncA*. Alguns trabalhos publicados demonstraram, utilizando o sequenciamento do gene *pncA*, uma grande correlação entre mutação nesse gene e resistência à Z em *M.tuberculosis* (HIRANO *et al.*, 1997 e MIYAGI *et al.*, 2004). BARCO, 2004 avaliou as mutações no gene *pncA* encontradas na maioria dos isolados clínicos de *M.tuberculosis* resistentes à Z de amostras brasileiras e concluiu que mutação nesse gene era o principal mecanismo de resistência e foram descritas nesse trabalho nove mutações novas. Outra conclusão descrita foi que deveria haver um outro mecanismo de resistência ainda não conhecido nas cepas de isolados clínicos de *M.tuberculosis* resistentes à Z sem qualquer alteração no gene *pncA* ou sua respectiva região promotora (BARCO *et al.*, 2006).

O CDC em Atlanta recomenda que os testes de sensibilidade aos fármacos sejam realizados nos isolados de *M.tuberculosis* e o método escolhido como referência nos Laboratórios de Saúde Pública no Brasil é o das proporções. Esse método tem baixo custo, contudo os resultados da sensibilidade aos fármacos são fornecidos a partir do vigésimo oitavo dia de incubação (BRASIL, 2004). Outros métodos para detecção de resistência aos fármacos são descritos a seguir:

- O método das proporções relaciona o número de colônias isoladas na superfície do meio contendo o fármaco que está em uma única concentração com o número de colônias no meio sem o fármaco (controle). Pode ser realizado na forma direta, analisando o escarro após descontaminação ou de forma indireta, analisando os bacilos isolados de material clínico.

- Teste da razão da resistência é um ensaio que relaciona a CIM da cepa estudada com o CIM da cepa de referência H37Rv. Se essa taxa for menor que dois, indica sensibilidade e se a taxa for maior que oito representa resistência ao fármaco. Esse teste apresenta baixo custo, fácil realização, mas com resultados a partir do vigésimo oitavo dia de incubação.

O E-test® utiliza uma tira de papel impregnada com um gradiente exponencial do antimicrobiano, e esta é colocada sobre a superfície de um meio sólido contendo o microrganismo a ser testado. A interpretação do resultado vai depender do ponto de cruzamento entre a elipse formada pela inibição e a concentração do fármaco.

Para se obter os resultados da sensibilidade dos isolados de *M.tuberculosis* aos anti micobacterianos em um menor tempo, novas metodologias que permitem o crescimento da micobactéria em meio líquido têm sido propostas:

- O meio de cultura BACTEC 460 TB ® é utilizado para realização dos testes de sensibilidade aos fármacos empregando meio líquido que contém ácido palmítico marcado com ^{14}C que é metabolizado pelos microrganismos viáveis, liberando CO_2 marcado com ^{14}C e evidenciado pela emissão de radiação. Mesmo apresentando a vantagem de fornecer o resultado em sete dias, esse teste emprega reagente radioativo e tem um alto custo (ROBERTS *et al.*, 1983).

- O BACTEC MGIT 960 ® apresenta a vantagem de não usar reagentes radioativos. Utiliza-se o meio Middlebrook 7H9 com 0,25% de glicerol e o crescimento do *M. tuberculosis* é detectado pelo indicador (rutênio) que fluoresce na ausência de oxigênio. O resultado é fornecido em cinco dias, mas tem também um elevado custo dos testes (SCARPARO *et al.*, 2004).

Com a finalidade de reduzir o custo e o tempo de execução dos testes de sensibilidade para as micobactérias, o sistema MABA foi adaptado para ser usado em microplaca de 96 orifícios. Após seis dias de incubação da micobactéria com o fármaco é adicionada a solução de alamar blue e observada a alteração da cor de azul para rosa após 24 horas de incubação (COLLINS & FRANZBLAU, 1997). Estudos científicos publicados recentemente demonstraram que o reagente óxido redutor resazurina, que é o princípio ativo do alamar blue, podendo substituí-lo e apresenta a mesma sensibilidade e especificidade no teste com um custo reduzido, quando comparado ao alamar blue (PALOMINO *et al.*, 2002 e MARTIN *et al.*, 2003). Um outro reagente colorimétrico (brometo de tetrazolium) foi empregado como revelador do crescimento micobacteriano e também demonstrou boa sensibilidade em testes de CIM em microplacas (CAVIEDES *et al.*, 2002).

Uma outra tecnologia para se detectar a resistência micobacteriana no teste de CIM empregou a bioluminescência produzida pelos genes inseridos em fagos específicos que

infectavam as micobactérias resistentes e expressavam no meio a enzima luciferase. Com a adição do substrato luciferina foi possível determinar a concentração do fármaco que inibiu o crescimento micobacteriano (SARKIS *et al.*, 1995; ARAIN *et al.*, 1996 e PEARSON *et al.*, 1996).

Como qualquer outra bactéria, o *M. tuberculosis* é passível de sofrer infecção por bacteriófagos específicos. Os micobacteriófagos foram isolados pela primeira vez em 1947 quando pesquisadores da Universidade de Washington coletaram folhas úmidas caídas no solo e colocaram na presença do *M. smegmatis* suplementado com carbonato de cálcio. Após um período de incubação foram verificadas áreas claras ou “plaques” na camada de *M. smegmatis* que cresciam sobre o agar nutriente. Nessas áreas claras foram isolados os primeiros micobacteriófagos, e sete anos depois foram identificados fagos que infectavam o *M. tuberculosis*. Atualmente existem mais de 250 micobacteriófagos que têm sido isolados do meio ambiente, animais e amostras humanas (GARDNER & WEISER, 1947; HATFULL & JACOBS, 1994 e BROXMEYER, 2004). Os micobacteriófagos são vírus DNA que após infecção da micobactéria e replicação do fago podem lisar a parede celular da bactéria hospedeira e liberar novas partículas virais. Algumas bactérias são resistentes à lise e continuam a crescer na presença do fago. BROWN *et al.*; 1997 demonstraram que o micobacteriófago temperado L5 possui a capacidade de inibir a expressão de seus genes líticos durante o crescimento lisogênico e com isso, não induzem a lise micobacteriana.

A capacidade dos micobacteriófagos de lisar as micobactérias permitiu a investigação do seu uso como agente terapêutico contra a tuberculose. Contudo um experimento avaliando o tratamento com fago em modelo animal não produziu a cura como também apresentou efeitos adversos que afetaram a sobrevivência dos animais (MANKIEWICZ

& BELAND, 1963 apud BROXMEYER, 2004). Um estudo mais recente demonstrou que a terapia fágica poderia ter efeitos benéficos em hamster com tuberculose disseminada, contudo o uso de H foi muito mais eficiente que o uso do fago e isso fez com que os autores não recomendassem o emprego dos fagos para esse objetivo (SULA *et al.*, 1981).

Os micobacteriófagos podem ser úteis na identificação da espécie micobacteriana utilizando um teste de tipagem por fago. BATES & MITCHISON; 1969 desenvolveram um método de tipagem das cepas de *M. tuberculosis* através da susceptibilidade por diversos fagos específicos provenientes de vários países e possibilitou classificá-las de acordo com as variações geográficas em: tipo A foi predominante em Hong Kong; o tipo B era mais comum no Nordeste da Europa e tipo C (intermediário de A e B) eram provenientes da Índia. Devido à dificuldade de se manipular os fagos e o longo tempo para se obter o resultado, a tipagem foi substituída pelas técnicas moleculares, principalmente RFLR e spoligotyping (VAN EMBDEN *et al.*; 1993).

O fago D29 é um micobacteriófago lítico que é capaz de infectar diversas espécies de micobactérias, como por exemplo, o *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* e *M. bovis* (PENA *et al.*, 1998). Demonstrou-se que *M. smegmatis*, 90 minutos após ser infectado pelo fago D29, liberou novas partículas virais, confirmando sua eficácia e especificidade (JONES & DAVID 1971). O fago D29 tem sido estudado e comparado com outros fagos (BARDAROV *et al.*, 1997; PENA *et al.*, 1998; KALANTRI *et al.*, 2005; RYBNIKER *et al.*, 2006 e GOMATHI *et al.*; 2007). Alguns estudos empregando o fago D29 demonstraram a sua utilidade no diagnóstico do *M. tuberculosis* e nos testes de sensibilidade aos fármacos por vários autores (WILSON *et al.*, 1997; ELTRINGHAM *et al.*, 1999 a,b; GALÍ *et al.*, 2006; CHAUCA *et al.*; 2007 e TRAORE *et al.*; 2007).

Figura 2 – Microscopia eletrônica do fago D29 (FORD *et al.*, 1998).

Figura 3 - Fago D29 infectando o *M. ulcerans* 1615 (RYBNIKER *et al.*, 2006).

O DNA do fago D29 é composto por 89 genes que estão agrupados de acordo com a sua função em um total de 49.136 pb. Os genes que codificam as proteínas do envelope e da cauda viral estão localizados na metade esquerda do mapa genético, enquanto que na metade direita do mesmo mapa estão os genes responsáveis pela replicação do DNA, recombinação e lise (**Figura 4**).

A sequência completa do genoma do fago D29 foi comparada com a sequência do genoma do fago temperado L5 que já havia sido analisada e foi demonstrada similaridade entre muitos genes, apesar do tamanho do genoma do fago D29 (49.136 pb) ser bem menor que o L5 (52.297 pb). Essas diferenças no genoma desses fagos aconteceram, possivelmente, em decorrência dos eventos de recombinação que poderiam ter sido em qualquer região do genoma do fago, mas somente eventos de recombinação que não afetaram a viabilidade é que permitiram a sobrevivência do vírus (HATFULL & SARKIS, 1993; FORD *et al.*, 1998 e PENA *et al.*, 1998).

Figura 4 – Organização genética dos fagos D29 e L5. Comparação dos mapas das regiões abertas de leitura (ORF) desses dois fagos. Os genomas são representados pelas barras horizontais brancas com marcadores verticais correspondentes a 1.000 pb. As ORFs são representadas em compartimentos horizontais com três sombreados e tamanhos diferentes. Os genes do fago D29 e do L5 recentemente identificados são representados em cores (FORD *et al.*, 1998).

Com o objetivo de desenvolver um teste diagnóstico para detecção do *M.tuberculosis* presente no escarro, McNERNEY *et al.*, 2004 utilizou a capacidade do fago D29 de se replicar rapidamente em micobactérias e desenvolveu um teste de replicação do fago. Nesse estudo foi demonstrado que o fago D29 infectou as cepas de BCG em 30 min. e que a lise micobacteriana ocorreu de 135 a 150 min. após a inoculação do fago D29. Nos isolados clínicos de *M. tuberculosis*, o D29 infectou a maioria das cepas em 20 min, demonstrando a especificidade pelo gênero *Mycobacterium* e a rapidez do processo de infecção. Para se avaliar a padronização do teste com o fago D29, os resultados das amostras foram comparados com o crescimento em Lowenstein-Jensen (L-J) e com a baciloscopia e teve, respectivamente 44,1% e 42,3% de sensibilidade. Por causa do baixo valor na sensibilidade, os autores não recomendaram a introdução dessa técnica na rotina diagnóstica da tuberculose pulmonar.

O fago D29 também tem sido avaliado em testes de sensibilidade aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose (TROLLIP *et al.*, 2001 e YZQUIERDO *et al.*, 2006). Um teste foi desenvolvido para avaliar biologicamente a amplificação do fago (PhaB - "Phage amplified Biologically assay") e compará-lo à técnica de RT-PCR ("Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction") para detecção de resistência à R. O RNAm de uma proteína de choque térmico codificada pelo gene *dnaK* do *M.tuberculosis* foi escolhido para ser amplificado e com isso detectar a viabilidade da micobactéria. Após inoculação do *M.tuberculosis* por 18 horas com 4 µg/mL de R o ensaio PhaB demonstrou concordância de 100% quando comparado ao teste da razão da resistência e a RT-PCR demonstrou concordância de 96% aos isolados clínicos sensíveis e 97% aos isolados clínicos resistentes (ELTRINGHAM *et al.*, 1999a). SILVA *et al.*, 2006 avaliaram isolados clínicos de *M.tuberculosis* com perfil de resistência conhecido para H e R. Nesse estudo, dois testes

que empregavam indicadores de óxido-redução (alarmar blue e MTT) foram comparados com o ensaio PhaB. A sensibilidade e especificidade do teste que emprega o fago D29 foram de 90% e 88% para H e 87,5% e 100% para R, respectivamente. O método alamar blue apresentou 100% de concordância com o método das proporções. Os autores concluíram que as técnicas do alamar blue (MABA) e o fago D29 (ensaio PhaB) para identificar cepas resistentes aos fármacos apresentaram boa sensibilidade e especificidade quando comparadas ao método das proporções e que poderiam ser utilizadas como métodos alternativos para identificação de MDR-TB. O alamar blue permitiu a leitura da sensibilidade em sete dias com o custo por teste de três dólares, enquanto que ensaio PhaB reduziu o tempo para três dias com custo de um dólar.

Em 2000, o Laboratório BIOTEC produziu um conjunto de reagentes para detecção rápida de *M.tuberculosis* em escarro utilizando bacteriófago (fago D29) e está sendo comercializado pelo nome de *FASTPlaque TB™*. O *FASTPlaque TB™* emprega os micobacteriófagos para demonstrar a presença de *M.tuberculosis* viáveis presentes em isolados clínicos. A amostra é primeiro descontaminada e as micobactérias presentes são rapidamente infectadas pela solução contendo o fago - "actiphage". A mistura resultante é tratada com uma solução virucida, o "virusol" que promove a destruição de todos os bacteriófagos que não infectaram as micobactérias, mantendo viáveis somente as que estão no interior das micobactérias. Esses bacteriófagos continuam a se replicar até novos fagos serem liberados após lise bacteriana. Esses fagos são amplificados pela introdução em células hospedeiras de crescimento rápido e não patogênicas - "sensor cells". Os bacteriófagos recém formados são visualizados como áreas claras denominadas "plaques". O número de plaques formados são derivados do número de *M.tuberculosis* viáveis (MAREI *et al.*, 2003) (**Figura 5**).

(1) Expansão do fago D29

Figura 5 – Representação esquemática e ilustrativa do ensaio PhaB.

Muitos trabalhos científicos têm sido publicados com o objetivo de avaliar a utilização do *FASTPlaque TB™* (ALBERT *et al.*, 2002; MUZAFFAR *et al.*, 2002; ALBAY *et al.*, 2003 e KALANTRI *et al.*, 2005).

Um outro estudo foi realizado com o propósito de avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo para detecção de *M.tuberculosis* em amostras de escarro com o kit *FASTPlaque TB™*, o ensaio PhaB e AMTD ("Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct test" - Gen Probe, San Diego, CA, USA), sendo esse último um kit comercial que emprega sondas de DNA marcadas com reagentes quimioluminescentes que hibridam ao RNAr do *M.tuberculosis*. Os autores inicialmente avaliaram dois protocolos para descontaminação do escarro e verificaram que 40,4% das amostras contaminaram-se quando foi empregado o protocolo sugerido pelo kit *FASTPlaque TB™* e que a contaminação foi reduzida para 5,8% com a técnica de Petroff modificada. O ensaio PhaB apresentou 45,3% de sensibilidade, 94,7% de especificidade, 88,9% de valor preditivo positivo e 65,1% de valor preditivo negativo. Com esses resultados, os autores concluíram que não era vantajoso analisar as amostras de escarro pelos testes empregando bacteriófagos e que a técnica AMDT apresentava mais sensibilidade que a microscopia, contudo era inadequada para ser realizada em países africanos devido ao alto custo e necessidade de profissionais especializados (MBULO *et al.*, 2004). BUTT *et al.*, 2004 avaliaram o kit *FASTPlaque TB™*, na detecção rápida de *M.tuberculosis* em escarro e utilizaram a cultura como padrão-ouro. Para isso foram analisadas 160 amostras de escarro. A sensibilidade do *FASTPlaque TB™* foi de 77% e a especificidade de 96% com os resultados obtidos em 48 horas. As amostras de escarro eram todas provenientes do Norte do Paquistão e os resultados foram comparáveis com um estudo conduzido na África do Sul (ALBERT *et al.*, 2002) e no Paquistão (MUZAFFAR *et al.*, 2002).

Os micobacteriófagos também têm sido clonados com o objetivo de transportar "gene reporter" que funcionam como marcadores do crescimento bacteriano no teste de sensibilidade (JACOBS *et al.*, 1993 e RISKA *et al.*, 1997). SARKIS *et al.*, 1995 construíram o

fago recombinante L5::*Fflux* inserindo, por recombinação homóloga o gene que codifica a luciferase em uma região intergênica do L5, mais precisamente entre os genes, que codificam respectivamente RNAt triptofano e RNAt glutamina. O L5::*Fflux* identificou *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos na determinação da CIM através da expressão da luciferase. Com a adição da luciferina foi possível correlacionar a variação da intensidade de luz com o crescimento micobacteriano (CARRIÈRE *et al.*, 1997).

PEARSON *et al.*, 1996 construíram um fago D29 recombinante (D29::*Luc*) inserindo o promotor da hsp60 e o gene da luciferase em uma região próxima a extremidade coesiva direita. Nesse trabalho foi demonstrado que essa região não é essencial para o D29 e que o promotor hsp60 inserido induziu a expressão da luciferase, quando o fago infectava as micobactérias. Contudo, a grande desvantagem desse método é a necessidade do substrato, que quando degradado, não emite mais sinal, limitando a utilização desse teste. Por isso, outros genes precisam ser testados e empregados como “gene reporter”.

A proteína verde fluorescente (GFP – “green fluorescent protein”) é uma proteína que fluoresce espontaneamente e foi isolada de algas marinhas, como a *Aequoria victoria*, uma medusa totalmente transparente que apresenta grânulos bioluminescentes ao redor do seu corpo.

O grupo fluoróforo da GFP está situado no centro geométrico, formando um segmento irregular α -hélice, formada pela sequência interna de três aminoácidos Ser⁶⁵–Tir⁶⁶–Gli⁶⁷ (serina posição 65 – tirosina posição 66 – glicina posição 67). A GFP, forma selvagem, tem como estrutura tridimensional, 11 fitas que formam um cilindro simétrico em forma de barril. Esses cilindros possuem um diâmetro de cerca de 30 Å a 40 Å de comprimento (CODY *et al.*, 1993). A GFP é uma molécula globular, compacta e ácida

composta por monômeros de massa molar de 27 KDa (PRASHER *et al.*, 1992 e CRAMERI *et al.*, 1996). A GFP absorve luz UV e luz azul com um pico máximo a 395 nm e um pico menor a 470 nm, emitindo luz verde com um pico máximo de emissão a 509 nm. A GFP uv, proteína verde fluorescente recombinada, emite uma máxima fluorescência quando excitada por luz ultravioleta e foi desenvolvida introduzindo mutações *in vitro* no DNA da GFP trocando três aminoácidos [Phe⁹⁹ para Ser (fenilalanina posição 99 para serina), Met¹⁵³ por Thr (metionina posição 153 por treonina) Val¹⁶³ para Ala (valina posição 163 por alanina)], resultando na GFP uv. Essa forma mutante expressa pela *Escherichia coli* apresenta fluorescência 18 vezes mais intensa que a GFP, quando excitada pela luz UV (CRAMERI *et al.*, 1996). A GFP na presença de fortes agentes redutores converte-se em GFP não fluorescente, uma vez que a proteína necessita de oxigênio molecular para formação do grupo fluoróforo, onde a etapa limitante da reação é a oxidação Thy⁶⁶, mas o processo é reversível na presença de oxigênio (INOUE & TSUJI, 1994).

ROBART & WARD, 1990 realizaram um estudo utilizando a GFP *in vivo* e demonstraram que a proteína resiste a temperaturas de 70°C, a pH alcalino, alguns solventes orgânicos, detergentes e algumas proteases.

A clonagem molecular da GFP e a demonstração de que essa proteína pode ser expressa como um gene funcional tem permitido novas investigações celulares. A GFP tem sido expressa em bactérias (CHALFIE *et al.*, 1994; BURLAGE *et al.*, 1996; CHRISTENSEN *et al.*, 1996 e BALISH *et al.*, 2003), fungo (KAHANA *et al.*, 1995), plantas (CASPER & HOLT, 1996 e EPEL *et al.*, 1996) e em células mamárias (LUDIN *et al.*, 1996).

O gene (*gfp*) que codifica a proteína verde fluorescente tem sido utilizado em estudos da infecção pelo *M. tuberculosis* como marcador de proteínas estruturais (GANGOPADHYAY *et al.*, 2003; BI *et al.*, 2005; CABANTOUS *et al.*, 2005), expressão gênica (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 1995; KREMER *et al.*, 1995; LUO *et al.*, 1996; LUO *et*

al., 2000; JENSEN-CAIN & QUINN, 2001; SAMPSON *et al.*, 2001; TULLIUS *et al.*, 2001; PURKAYASTHA *et al.*, 2002; BLOKPOEL *et al.*, 2003; O'TOOLE *et al.*, 2003 e YAMAZAKI *et al.*, 2006), estudo da cultura de células infectadas com micobactérias (CASTRO-GARZA *et al.*, 2002), na resistência aos quimioterápicos (COLLINS *et al.*, 1998; MASTER *et al.*, 2001 e DANELISHVILI *et al.*, 2005) e interação com macrófagos (SRIVASTAVA *et al.*, 2007). A enorme flexibilidade como um marcador não invasivo em células vivas permitiu a utilização da GFP em numerosas aplicações, tais como expressão como gene reporter. A GFP não necessita de substrato para emissão da fluorescência que é mantida por um longo período de tempo. As principais micobactérias de interesse clínico são susceptíveis à infecção lítica pelo fago D29 (RYBNIKER *et al.*, 2006) e a proteína verde fluorescente emite sinal na ausência de co-fatores e a emissão ocorre *in vivo* e em tempo real (BLOKPOEL *et al.*, 2003). Empregando a recombinação gênica, o presente projeto propõe a inserção do promotor *hsp70* do *M. tuberculosis* e do gene *gfp* no DNA do fago D29, construindo desse modo, um fago recombinante que pode ser utilizado como revelador nos testes de CIM. Por se tratar de uma técnica relativamente simples, rápida e de fácil leitura (leitor de fluorescência em microplacas), esse teste pode ser otimizado e empregado em regiões sem muitos recursos laboratoriais para a detecção de cepas MDR-TB com crescimento lento, possibilitando a realização dos testes de sensibilidade de forma efetiva e rápida.

OBJETIVOS

Objetivos

Geral

- Construir o fago recombinante D29 por recombinação contendo o promotor hsp70 e gene da proteína verde fluorescente para uso como revelador de crescimento micobacteriano nos testes de CIM.

Específicos

- Comparar o teste da CIM empregando a resazurina como revelador com o método das proporções aos fármacos isoniazida, rifampicina, estreptomicina e etambutol.
- Avaliar o grau de relação entre os isolados de *M.tuberculosis* pela técnica do MIRU.
- Identificar os isolados de micobactérias por PCR IS6110 e PRA *hsp65*.
- Avaliar a utilização do fago D29::*gfp* como revelador de crescimento micobacteriano no teste de CIM com leitura semi-automatizada.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Amostras micobacterianas

Os cem isolados clínicos de *Mycobacterium sp.* sensíveis e resistentes aos fármacos (H, R, E e S) utilizados nesse estudo foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Micobactérias do Instituto Clemente Ferreira (ICF) em São Paulo.

Os isolados clínicos foram identificados bioquimicamente (BRASIL, 2005) e molecularmente utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação da sequência de inserção IS6110 (VAN EMBDEN *et al.*, 1993) e por PRA ("PCR-Restriction Enzyme Analysis") para amplificação e posterior digestão do fragmento do gene *hsp65* (TELENTI *et al.*, 1993c). Os isolados de *M.tuberculosis* foram todos caracterizados molecularmente utilizando a metodologia "Mycobacterial Interspersed Repetitive Units" (MIRU) (SUPPLY *et al.*, 2001).

3.1.1 – Cultura das amostras clínicas

Todos os isolados clínicos de *Mycobacterium sp* foram identificados pelos aspectos das colônias, tempo de crescimento e provas bioquímicas como produção de niacina, redução do nitrato e crescimento em PNB e TCH.

3.1.2 – Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade antimicrobiana escolhido como padrão-ouro foi o método das proporções utilizando meio base de ovo Lowenstein-Jensen (L-J) (BBL

TM - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) e incubado em estufa a 35° C durante 30 dias (CANETTI *et al.*, 1963). As concentrações críticas dos antimicrobianos utilizados no meio L-J para H, R, S e E foram 0,2; 40; 4 e 2 µg/mL respectivamente. As proporções críticas de mutantes resistentes para os isolados clínicos foram de 1 % para H, R, E e de 10% para S (BRASIL, 2005).

Todos os isolados clínicos de *Mycobacterium sp.* sensíveis e resistentes aos fármacos estudados foram cultivados em meio L-J (BBL TM - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) a temperatura de 35° C durante 30 a 60 dias. Os isolados clínicos foram estocados na micobacterioteca do Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP) em L-J (BBL TM - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) a 4 – 8° C e também congelados a – 80° C (Forma Scientific, Ohio, EUA) em miçangas contendo o meio Sauton para futuros testes microbiológicos e de biologia molecular (JONES & PELL, 1991).

3.2 - Determinação da CIM empregando REMA

Realizada no Laboratório de Micobactérias do Instituto Clemente Ferreira.

A determinação da CIM para os isolados clínicos do *Mycobacterium sp* foi realizada em microplaca utilizando a resazurina (SIGMA-ALDRICH Inc., St Louis, MO, EUA) como agente revelador de crescimento micobacteriano – que é um indicador de óxido-redução denominado REMA (“resazurin microtiter assay plate”) (PALOMINO *et al.*, 2002).

3.2.1 - Preparo das suspensões micobacterianas

As suspensões micobacterianas foram preparadas dispensando-se uma alçada do crescimento em L-J (BBL TM - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) das micobactérias em 2 mL de água destilada estéril em tubos de vidro 16 x 150 mm, com tampa de rosca. Após homogeneização em agitador mecânico, 200 µL dessa mistura foram transferidas para um tubo contendo 2 mL de meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL TM - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA). As suspensões micobacterianas foram suavemente homogeneizadas e incubadas em estufa a 35 – 37° C durante 8 a 10 dias. Após esse período de incubação foi realizada a comparação visual da turvação (crescimento bacteriano) com a escala de McFarland nº 1 (aproximadamente 10⁷ microrganismos por mL). Quando o crescimento micobacteriano apresentou maior turvação que a escala de McFarland nº 1, as culturas foram diluídas utilizando-se Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL TM - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA). Quando o crescimento bacteriano apresentou turvação menor ao ser comparado com a escala de McFarland nº1 foram realizados repiques em novo meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL TM - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA).

Uma vez padronizada a suspensão micobacteriana, realizou-se diluição na proporção 1:25 em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL TM - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) para em seguida fazer a semeadura nas microplacas (Falcon 3072, Becton Dickinson, Lincoln Park, EUA).

3.2.2 - Preparo das soluções dos fármacos para a realização do REMA

As soluções estoques de H, R, E e S (10.000 µg/mL) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EUA) foram preparadas (0,1 g do fármaco em 10 mL de água deionizada estéril) com exceção da R que foi diluída em metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e em seguida foram congeladas a -20° C, recebendo a denominação de “solução estoque 1”. A “solução estoque 1” foi diluída a uma concentração de 1.000 µg/mL [10 µL da “solução estoque 1” + 90 µL de Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA)], sendo denominada “solução estoque 2”. A “solução estoque 2” foi diluída a uma concentração de 100 µg/mL [10 µL da “solução estoque 2” + 90 µL de Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA)] e foi denominada “solução estoque 3”.

A partir da “solução estoque 3” foi preparada a solução de trabalho de 4 µg/mL para R e H, que ao ser diluída no primeiro orifício na placa durante a realização do REMA, a concentração do fármaco foi de 1 µg/mL.

As concentrações das soluções de trabalho para a S foi de 32 µg/mL (na placa era de 8 µg/mL) e para E foi de 64 µg/mL (na placa era de 16 µg/mL).

- As concentrações de H e R para a realização do REMA na placa foram 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03; 0,015 µg/mL (**Figura 6**)

- As concentrações de S para a realização do REMA na placa foram de 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 µg/mL (**Figura 6**)

- As concentrações de E para a realização do REMA na placa foram de 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 6**)

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo

3.2.3 - Esquema das microplacas utilizadas no REMA

Em uma microplaca estéril de 96 orifícios transparente (Falcon 3072, Becton Dickinson, Lincoln Park, EUA) foram pipetados 200 μL de água destilada estéril em todos os orifícios das colunas 1 e 12 para evitar a evaporação durante a incubação na estufa.

A seguir foram pipetados 150 μL de meio Middlebrook 7H9 - linha A (colunas 2 – 5 e 7 – 10) - **controle dos fármacos**

Na linha A/col. 2 e 7 foram acrescentados 50 μL da solução de H a 4 $\mu\text{g/mL}$

Na linha A/col. 3 e 8 foram acrescentados 50 μL da solução de R a 4 $\mu\text{g/mL}$

Na linha A/col. 4 e 9 foram acrescentados 50 μL da solução de S a 32 $\mu\text{g/mL}$

Na linha A/col. 5 e 10 foram acrescentados 50 μL da solução de E a 64 $\mu\text{g/mL}$

Nas linhas de B a H / nas col. de 2 - 5 e 7 - 10 foram pipetados 100 μL de 7H9 – **diluição dos fármacos**

Na linha B/col. 2 e 7 foram acrescentados 100 μL da solução de H a 4 $\mu\text{g/mL}$

Na linha B/col. 3 e 8 foram acrescentados 100 μL da solução de R a 4 $\mu\text{g/mL}$

Na linha B/col. 4 e 9 foram acrescentados 100 μL da solução de S a 32 $\mu\text{g/mL}$

Na linha B/col. 5 e 10 foram acrescentados 100 μL da solução de E a 64 $\mu\text{g/mL}$

Após homogeneização, 100 µL da linha B (col. 2 – 5) foram transferidos para a linha C e assim sucessivamente até a linha H onde após homogeneização foram desprezados 100 µL.

Da mesma maneira, 100 µL da linha B (col. 7 – 10) foram transferidos para a linha C e assim sucessivamente até a linha H onde após homogeneização foram desprezados 100 µL.

Após ter sido realizada a diluição dos fármacos nas microplacas, adicionou-se 100 µL da suspensão de micobactérias padronizadas com a escala de McFarland nº 1 e diluídas a 1:25, com exceção da linha A e dos controles do meio.

Nas col. 6 e 11 / linhas A – D foram acrescentados 200 µL do 7H9 – **controle do meio**

Nas col. 6 e 11 / linhas E – H – foram acrescentados 100 µL da suspensão bacteriana e 100 µL do meio 7H9 – **controle da viabilidade bacteriana**.

Em cada placa foram analisados dois isolados clínicos quanto ao perfil de sensibilidade a H, R, E e S.

As microplacas foram seladas com parafilm e incubadas a 37° C (Nova Ética, São Paulo, Brasil). No sétimo dia de incubação, os controles de viabilidade micobacteriana e de esterilidade do meio de cultivo foram revelados pela adição de 30 µL da solução de resazurina (SIGMA-ALDRICH Inc., St Louis, MO, EUA) a 0,01% em água destilada estéril recém preparada. As placas foram fechadas, seladas e incubadas novamente por mais 24 horas a 35° C (Nova Ética, São Paulo, Brasil). Após esse período foram realizadas as leituras dos controles de viabilidade micobacteriana e de esterilidade do meio de cultivo. Quando os controles apresentavam resultados de crescimento positivo no controle de viabilidade

bacteriana (cor rosa) e negativo no controle de esterilidade do meio de cultivo (cor azul), os testes foram revelados pela adição de nova solução de resazurina (SIGMA-ALDRICH Inc., St Louis, MO, EUA) a 0,01% recém preparada a cada diluição do fármaco e lidos após incubação de 24 horas a 35° C (Nova Ética, São Paulo, Brasil). Quando os controles apresentaram alteração de crescimento micobacteriano ou de contaminação por outras bactérias ou fungos, os testes foram descartados e realizados novamente. A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento micobacteriano e desenvolvimento de cor rósea, como presença de crescimento micobacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração de fármaco capaz de inibir o crescimento de 90% da cepa de micobactéria, ou seja, a menor concentração da droga capaz de impedir a mudança de cor de azul para róseo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	H ₂ O	H	R	S	E	cont	H	R	S	E	cont	H ₂ O
A
B
C
D
E
F
G
H

Figura 6 – Esquema das microplacas no REMA.

Siglas H (isoniazida), R (rifampicina), S (estreptomicina), E (etambutol), cont (controles do meio) e bac (controle da viabilidade bacteriana).

3.3 – Identificação e caracterização molecular dos isolados clínicos de *Mycobacterium sp.*

Realizada em colaboração no Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista de Araraquara (FCF-UNESP).

Para a identificação molecular das micobactérias provenientes dos isolados clínicos empregou-se a PCR para amplificação da sequência de inserção IS6110 e confirmação do *M.tuberculosis* (VAN EMBDEN *et al.*, 1993). As amostras de DNA das micobactérias de isolados clínicos que não amplificaram pela PCR IS6110 foram avaliadas pela metodologia PRA (TELENTI *et al.*, 1993c). A técnica do MIRU foi realizada para construção do dendrograma e análise epidemiológica dos isolados clínicos do *M.tuberculosis* utilizando o programa PAST (Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis) (SUPPLY *et al.*, 2001).

3.3.1- Extração do DNA genômico por termólise

Na técnica de termólise um volume de 300 µL de TE-Triton 1% (Tris-HCl 10mM; NaCl 1 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) foi pipetado em um tubo de 1,5 mL tipo eppendorf e depois foi adicionada uma alçada da cepa micobacteriana. Os tubos foram submetidos à temperatura de 100° C durante 10 min. e em seguida congelados a -20° C por mais 10 min. Esse procedimento de choque térmico foi repetido por mais três vezes, centrifugado (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Alemanha)

a 4.000 rpm e armazenado a -20°C .

3.3.2 - Avaliação eletroforética do DNA genômico

A integridade das amostras de DNA foi avaliada em gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia) a 1,5% em tampão TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) em cuba de eletroforese horizontal (GIBCO BRL, Life Technologies™ Inc., Gaithersburg, MD, EUA). O gel foi imerso em tampão TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) e as amostras contendo 5 μL do DNA e 1 μL do tampão da amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 30%) foram aplicadas no gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia). Aplicou-se também 5 μL de marcador de tamanho molecular de DNA de 1.000 pb (1Kb) (GIBCO BRL, Life Technologies™, Grand Island, EUA) diluído na proporção de 1:6 em tampão de amostra. A separação eletroforética foi realizada a 100V, 60 mV por 1 hora, empregando fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo).

Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g/mL}$ durante 15 min. e lavados em água destilada. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

3.3.3 - Quantificação e análise de pureza da amostra de DNA genômico

A quantificação e análise de pureza (relação A260/A280) das amostras de DNA extraídas foram realizadas por espectrofotometria em UV (Beckman DU 640, Fullerton, CA, EUA) após diluição (1:10) das amostras em tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). Os DNAs foram armazenados à temperatura de -20° C para uso posterior (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

3.3.4 - Identificação molecular pela PCR IS6110

Inicialmente todas as amostras de DNA de isolados clínicos de *Mycobacterium sp* foram extraídas e amplificadas pela PCR empregando pares de oligonucleotídeos iniciadores que amplificavam especificamente fragmentos de 245 pb contidos na sequência de inserção IS6110 descritas por VAN EMBDEN *et al.*, 1993.

Na composição de reagentes da PCR foram utilizados: 5 µL de amostra de DNA obtida pela técnica de termólise; 2,5 µL de tampão de PCR 10 x; 0,5 µL de dNTPs (10 mM cada); 0,6 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a 5 µM (INS1 e INS2); 0,5 µL de *Taq* DNA - polimerase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e água ultrapura estéril até completar o volume de 25µL .

Os ensaios da PCR foram realizados utilizando-se termociclador PTC-100 (M & J Research, Wathertown, EUA) sob as seguintes condições: etapa inicial a 95° C por 10 min. (uma única vez); amplificação de 30 ciclos de 94° C por 1 min./ 56° C por 2 min. / 72° C por 1 min. A etapa final foi de 72° C por 7 min. Os produtos

de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia) 1% em TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) tendo como referência padrão de tamanho molecular de 100 pb (GIBCO BRL – Life Technologies™, Grand Island, EUA). O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL e os produtos de amplificação foram visualizados com o auxílio de um equipamento de fotodocumentação digital Alfa-imager 2200 (Alfa Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA) que permitiu a digitalização da imagem do gel e a sua impressão em papel térmico.

3.3.5 - Identificação molecular pelo PRA gene *hsp65*

As amostras de DNA dos isolados clínicos que não amplificaram pela PCR seqüência de inserção IS6110 foram analisadas pelo PRA para amplificação do gene *hsp65* que gerou um produto de 430 pb útil na identificação da espécie micobacteriana (TELENTI *et al.*, 1993c).

Na composição de reagentes da PCR foram utilizados: 2 µL da amostra de DNA genômico obtido pela termólise; 0,25 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a 25 pmoles (Tb11 e Tb12); kit “PCR MASTER MIX” (PROMEGA – número de cat. M7501) que contém *Taq* DNA Polimerase, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 1,5 mM de MgCl₂ e tampão de reação, de acordo com a recomendação do fabricante.

Os ensaios da PCR foram realizados utilizando-se termociclador PTC-100 (M & J Research, Wathertown, EUA) sob as seguintes condições: etapa inicial a 95° C por 10 min. (uma única vez); amplificação de 45 ciclos de 94° C por 1 min./

60° C por 1 min. / 72° C por 1 min. A etapa final foi de 72° C por 7 min. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia) 1% em TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) tendo como referência padrão de tamanho molecular de 100 pb (GIBCO BRL – Life Technologies™, Grand Island, EUA). O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL e os produtos de amplificação foram visualizados com o auxílio de um equipamento de fotodocumentação digital Alfa-imager 2200 (Alfa Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA) que permitiu a digitalização da imagem do gel e a sua impressão em papel térmico.

3.3.5.1 - Digestão do fragmento *hsp65* amplificado pelo PRA

- Reação de digestão com *Bst* E II

Dez µL do produto correspondente ao fragmento *hsp65* (430 pb) amplificado pela PCR foi digerido com 0,5 µL da enzima *Bst* E II (Boehringer, Manheim, Alemanha); 2 µL do tampão e 7,5 µL de água Milli-Q estéril. A reação de digestão foi incubada por 60° C (TECHNE, DRI-BLOCK® , DB-2D, Cambridge, Inglaterra) por uma hora.

- Reação de digestão com *Hae* III

Dez µL do produto correspondente ao fragmento *hsp65* (430 pb) amplificado pela PCR foi digerido com 0,5 µL da enzima *Hae* III (Boehringer, Manheim, Alemanha); 2 µL do tampão e 7,5 µL de água Milli-Q estéril. A reação de digestão foi incubada por 37° C (FANEM®, modelo 102, São Paulo) por uma hora.

- Avaliação das reações de digestão enzimática *Hae* III e *Bst* E II

Os produtos da digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia) a 4 % em TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) . Vinte μL do produto de digestão mais 2,2 μL do tampão da amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 30%) foram depositados nos poços do gel de agarose, sendo que no primeiro poço e no do meio foram depositados 5 μL do marcador de tamanho molecular de 50 pb e no último poço o mesmo volume do marcador de tamanho molecular de 25 pb (GIBCO BRL, Life Technologies™, Grand Island, EUA). O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e os produtos de amplificação foram visualizados com o auxílio de um equipamento de fotodocumentação digital Alfa-imager 2200 (Alfa Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA) que permitiu a digitalização da imagem do gel e a sua impressão em papel.

3.3.6 - Caracterização molecular pelo MIRU

Para a realização do MIRU foram utilizados 12 pares de oligonucleotídeos iniciadores referentes aos 12 loci do MIRU descritos por SUPPLY *et al.*, 2001.

Na composição de reagentes de PCR foram utilizados: 2 μL de DNA genômico, 1 μL de cada oligonucleotídeo iniciador (previamente diluídos para concentração final de 0,4 μM), o kit “PCR MASTER MIX” (PROMEGA – número de

cat. M7501) que contém *Taq* DNA Polimerase, 200 μ M dATP, 200 μ M dCTP, 200 μ M dGTP, 200 μ M dTTP, 1,5 mM de $MgCl_2$ e tampão de reação.

Os ensaios de PCR foram realizados utilizando-se termociclador PTC-100 (M & J Research, Wathertown, EUA) sob as seguintes condições: etapa inicial a 95° C por 5 min (uma única vez); amplificação de 40 ciclos de 94° C por 1 min; 50° C (locus 24 e 26) / 55° C (demais loci) por 1 min. e 72° C por 2 min. Os produtos de amplificação com tamanho variável foram separados por eletroforese em gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia) a 2% em TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) tendo como referência padrão de peso molecular de 25, 50 e 100 pb (GIBCO BRL, Life Technologies™, Grand Island, EUA); o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 μ g/mL e os produtos de amplificação foram visualizados com o auxílio de um equipamento de fotodocumentação digital Alfa-imager 2200 (Alfa Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA) que permitiu a digitalização da imagem do gel e a sua impressão em papel térmico.

3.4 - Experimentos com o fago D29

Realizados no Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP.

3.4.1 - Propagação do fago D29 em meio líquido (McNERNEY, 2004)

O meio Middlebrook 7H9 acrescido de 0,2 % de glicerina foi autoclavado (FANEM®, modelo 415, São Paulo, Brasil). No momento do uso foi suplementado com 10% de OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD,

EUA). Uma alçada de *M. smegmatis* mc² 155 foi adicionada e incubada a 37° C / 150 rpm / 16 horas (TECNAL®, Piracicaba, Brasil). Após esse período, CaCl₂ 0,1M e a suspensão do fago D29 foram incorporados ao meio e deixado sob as mesmas condições de incubação por mais 12 horas. Após esse período, o meio contendo novas partículas de fago foi centrifugado a 4° C / 10.000 rpm / 10 min. (Eppendorf, modelo 5804 R, Hamburg, Alemanha) e transferido o sobrenadante para um novo tubo estoque de fago.

3.4.2 - Titulação do fago D29 em meio agar (TSA)

Uma aliquota de 10 µL de cada diluição do fago foi depositada sobre a superfície do meio TSA (agar caseinato de soja - Difco™, Sparks, MD, EUA), previamente semeado de forma homogênea com uma suspensão da cepa de *M. smegmatis* mc² 155. As placas foram incubadas a 37° C (Nova Ética, São Paulo, Brasil) por 24 horas para a leitura dos “plaques” de lise formados. A maior diluição onde houve a formação de lise foi considerada o título do fago (CAMPOS, 2001).

3.4.3 - Extração do DNA do fago D29

O DNA do fago D29 foi extraído segundo SAMBROOK & RUSSEL., 2001, Protocolo 12, v.1 e página 2.57: foram transferidos 200 µL da suspensão fágica para um tubo de 1,5 mL tipo eppendorf e acrescentados 8 µL de EDTA 0,5 M (GIBCO BRL, Life Technologies™, NY, EUA) (concentração final de 20 mM); 2 µL de proteinase K (GIBCO BRL, Life Technologies™, NY, EUA) (concentração final de 50 µg/mL) e 21 µL de SDS (GIBCO BRL, Life Technologies™, NY, EUA)

(concentração final de 0,5%). Em seguida a mistura foi incubada por 1 hora a 56° C (TECHNE, DRI-BLOCK®, DB-2D, Cambridge, Inglaterra) e depois esfriada em T.A. Um volume equivalente de fenol equilibrado (USB, Cleveland, EUA) foi adicionado e homogeneizado. As fases aquosas e orgânicas foram separadas por centrifugação (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Alemanha) a 5.000 rpm por 5 min. em T.A. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo, extraindo a fase aquosa foi tratada uma vez com a mistura de fenol equilibrado (USB, Cleveland, EUA) e clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) (1:1). A fase aquosa foi recuperada pela centrifugação (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Alemanha) a 5.000 rpm por 5 min. em T.A. e repetida a extração com um volume equivalente de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha). O DNA do fago D29 foi recuperado pela precipitação com etanol 70% gelado e centrifugado (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Alemanha) a 12.000 rpm por 5 min. O etanol foi retirado do tubo e o sedimento de DNA deixado a T.A para completa evaporação do etanol. O DNA do fago D29 foi, então, ressuspendido em 30 µL de T.E (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

3.4.4 - Protocolo padrão de extração de DNA pelo kit “wizard lambda Preps DNA purification system” da Promega

Dez mL do estoque do fago foi incubado a 37° C com 40 µL de mistura de nuclease (FANEM®, modelo 102, São Paulo, Brasil) por 15 min. A seguir foram adicionados 4 mL de precipitante do fago e colocado no gelo por 30 min. e em seguida centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. (Eppendorf 5804 R, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido com 500 µL do tampão do fago, centrifugado (Eppendorf 5804 R, Hamburg, Alemanha),

transferido para um novo tubo e adicionado 1 mL da resina de purificação. A resina foi eluída por pressão através de uma seringa numa minicoluna. A resina foi lavada com 2 mL de isopropanol a 80% e a minicoluna adaptada em um tubo eppendorff de 1,5 mL para eluição do DNA retido. Cem μ L de água estéril foram pré-aquecidas e colocadas na minicoluna, esse dispositivo (coluna e tubo eppendorff) foi centrifugado (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Alemanha). O DNA foi eluído da coluna para o interior do eppendorff e este foi armazenado a -20° C.

3.4.5 - Identificação do sítio de restrição adequado para clivar o DNA do fago D29 para inserção do fragmento *hsp70-gfp*

Para essa finalidade foi utilizada a sequência disponível (número de acesso NC 001900, gi 9630386) no Banco de genes (Gen Bank) do National Institute of Health (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov). O genoma completo foi analisado empregando o programa Primer Premier® v.5,0 (Premier Biosoft International, EUA) para localizar nas regiões intergênicas um sítio de restrição enzimática. Inicialmente foram avaliados os sítios de restrição enzimática presentes nas regiões intergênicas próximas à extremidade coesiva direita no mapa genético do fago D29 (**Figura 4**) e certificado que esse sítio enzimático não estava presente em qualquer outra posição no DNA do fago D29. O único sítio de restrição que demonstrou possibilidade real para utilização foi da enzima de restrição *Spe I*, que clivou o DNA do fago D29 nas posições 38.320 pb e 48.291 pb, sendo esse último uma região intergênica.

Portanto ao clivar o DNA do fago D29 com a enzima de restrição *Spe I*, três fragmentos de DNA foram gerados:

- Posição 0 a 38.320 pb (tamanho de 38.320 pb)
- Posição 38.321 a 48.291 pb (tamanho de 9.971 pb)
- Posição 48.292 a 49.136 pb (tamanho de 845 pb)

3.4.6 - Digestão do DNA do fago D29 pela enzima *Spe I*

A concentração de 25-50 µg /µL de DNA do fago D29 foi diluída em T.E (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) para um volume final de 170 µL. Foram adicionados 20 µL do tampão da enzima 10 x [33 mM de Tris-acetato (pH 7,9), 10 mM de acetato de magnésio, 66 mM de acetato de potássio e 0,1 mg/mL de BSA]. Duas alíquotas de 0,2 µg de DNA do fago D29 foram estocadas para uso como controle durante a eletroforese. Foram adicionados de 75 - 400 U da enzima *Spe I* (Invitrogen, Life Technologies, 200 U – 10 U/µL) e a reação foi incubada por 1 hora a 37° C (FANEM®, modelo 102, São Paulo, Brasil). A reação foi interrompida resfriando em banho de gelo e removida uma alíquota de 0,2 µg. Posteriormente essas alíquotas foram avaliadas em gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia) a 1,5% em tampão TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) em cuba de eletroforese horizontal (GIBCO BRL, Life Technologies™, Gaithersburg, MD, EUA). O gel foi imerso em tampão TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) e as amostras contendo 5 µL do DNA e 1 µL do tampão da amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF e 0,25% e glicerol a 30%) foram aplicadas no gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia). Aplicou-se também 5 µL de marcador de tamanho molecular de DNA de 1.000 pb (1Kb) (GIBCO BRL – Life Technologies™, Grand Island, EUA) diluído na

proporção de 1:6 e tampão de amostra. A separação eletroforética foi realizada a 100V, 60 mV, por 1 hora, empregando fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo).

Os fragmentos foram recuperados do gel de agarose sob a luz UV utilizando um bisturi estéril e colocados em tubos tipo eppendorff de 1,5 mL. O kit GFX PCR DNA da GE (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia) foi empregado para purificação desses fragmentos: no gel de agarose contendo o fragmento de DNA foi acrescentado um volume equivalente de tampão de captura e incubado à 68° C (TECHNE, DRI-BLOCK® , DB-2D, Cambridge, Inglaterra) para completa dissolução da agarose. Esse material foi transferido para uma coluna contendo uma matriz de fibra de vidro e centrifugado (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Alemanha) à 5.000 rpm por 30 seg. Sobre a matriz foram pipetados 500 µL de tampão de lavagem e centrifugados nas mesmas condições anteriores. A coluna foi transferida para outro tubo eppendorff de 1,5 mL corretamente identificado e o DNA retido pela matriz foi eluído com 30 µL de água Milli-Q estéril ou TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0), centrifugado (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Alemanha) à 12.000 rpm por 30 seg. e acondicionado a -20° C até o uso.

3.4.7 - Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Realizado no Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP

A eletroforese em campo pulsado (Bio-Rad, Chef DR™III, Foster City, CA, EUA) foi uma estratégia empregada para separar os fragmentos de DNA do fago

D29 após restrição enzimática com *Spe I* utilizando gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia) 1% em TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) 0,5 x; 6 V/cm; 15° C com alteração do tempo de 0,5 a 1,5 segundos e vários tempos de corrida foram testados (5 a 20 horas), padronizando o tempo de 8 horas como o mais adequado. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o Lambda DNA-Mono cut Mix (BioLabs Inc, New England).

3.5 - Expansão do plasmídeo pYL GFP

O pYL GFP foi gentilmente doado pelo Prof. Yi Luo da University of Iowa – Boston – USA (LUO *et al.*, 2000) e tem inserido no seu sítio de múltipla clonagem o promotor da *hsp70* e o gene da proteína verde fluorescente (*gfp*), o gene de resistência da kanamicina, conforme representa a figura a seguir:

Figura 7 - Representação esquemática do pYL GFP.

Siglas = MCS – sítio de múltiplas clonagens; Prom. Hsp70 – promotor do gene da heat shock protein de 70 KDa (*hsp70*), GFP – gene da proteína verde fluorescente; Kan^r – gene de resistência a kanamicina; ori *E.coli* – origem em *E.coli*; ori myco – origem em micobactérias.

3.5.1- Produção de *E. coli* competentes

As cepas de *E.coli* DH5 α foram expandidas em meio LB agar (triptona 10g; extrato de levedura 5 g; NaCl 5 g; NaOH 1N 1 mL; agar 15 g; água destilada qsp 1.000 mL) por uma noite a 37° C (Nova Ética, São Paulo, Brasil) de acordo com o protocolo descrito em SAMBROOK & RUSSEL, 2001, no qual uma colônia foi isolada e inoculada em meio de LB líquido (triptona 10g; extrato de levedura 5 g; NaCl 5 g; NaOH 1N 1 mL; água destilada qsp 1.000 mL), à 37° C em agitação (250 ciclos/min) (TECNAL®, Piracicaba, Brasil) até a obtenção de crescimento exponencial (D.O 600 nm de 0,6 - aproximadamente 6 horas). Essa cultura foi transferida para um tubo estéril (Falcon Becton Dickinson, Lincon Park, EUA) de 50 mL, centrifugada à 4.000 rpm por 10 min. à 4° C (Eppendorf 5804 R, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado. O procedimento de centrifugação nas mesmas condições anteriores foi repetido, novamente descartado o sobrenadante e o sedimento ressuspensionado com 2 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado.

3.5.2 - Transformação das *E. coli* competentes

Em um tubo estéril de 15 mL (Falcon, Becton Dickinson, Lincon Park, EUA) foram adicionados 100 μ L da suspensão de células *E. coli* competentes e 1 μ L do plasmídeo pYL GFP. Procedeu-se a incubação por 3 min. em banho de gelo e a seguir à 42° C (TECHNE, DRI-BLOCK®, DB-2D, Cambridge, Inglaterra) por 1,5 min. e imediatamente ao banho de gelo por mais 5 min. Um mL do meio SOC

(triptona 2g; extrato de levedura 0,5 g; NaCl 0,05 g e água destilada qsp 100 mL) foi adicionado a 10 μ L de MgCl₂ 1M e 20 μ L de glicose 1M, incubado à 37° C (FANEM®, modelo 102, São Paulo, Brasil) por 5 min., sem agitação e a seguir por 60 min. com agitação. Posteriormente foi espalhado em meio LB agar (triptona 10g; extrato de levedura 5 g; NaCl 5 g; NaOH 1N -1 mL; agar 15 g; água destilada qsp 1.000 mL) contendo kanamicina (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EUA) (10 μ g/mL) e incubado 37° C (Nova Ética, São Paulo, Brasil) por uma noite. Os clones foram selecionados e expandidos em 5 mL de LB líquido com kanamicina (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EUA) (10 μ g/mL) por uma noite a 37° C com agitação (TECNAL®, Piracicaba, Brasil). O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit Flexi-Prep® (Amersham Biosciences, Pitscataway, EUA) segundo o fabricante.

3.5.3 - Produção do fragmento *hsp70-gfp* pela PCR

O plasmídeo pYL GFP foi utilizado como molde para a amplificação do DNA.

Um volume de 2 μ L foi amplificado em uma mistura contendo:

4 μ L de dNTPs (10 mM), 10 μ L do tampão da *Taq* 10 x (contendo 2 mM de MgCl₂) (Biotools), 2 μ L de cada iniciador (0,01 nM/ μ L), 2 μ L *Taq* DNA polimerase (1 U/ μ L) para um volume final de reação de 100 μ L. As amplificações padronizadas mantiveram o seguinte ciclo:

Os ensaios de PCR foram realizados utilizando-se termociclador PTC-200 (M & J Research, Wathertown, EUA) sob as seguintes condições: etapa inicial a 98° C por 3 min. (uma única vez); amplificação de 35 ciclos de 95° C por 1 min / 51,9° C por 2 min e 72° C por 2 min, com uma extensão final de 72° C por 10 min. O

gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL, os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia) a 1% em TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM) tendo como referência padrão de peso molecular de 1 Kb (GIBCO BRL, Life Technologies™, Grand Island, EUA) em cuba de eletroforese horizontal (GIBCO BRL, Life technologies Inc, Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

3.5.4 - Digestão do fragmento *hsp70-gfp* pela *Spe I*

Um volume de 4 µL do produto de PCR foi digerido com 2 µL da *Spe I* (Invitrogen, Life Technologies, 200 U – 10 U/µL), 4 µL do tampão da enzima 10X e 30 µL de água Milli-Q estéril para um volume final de 40 µL da reação. A digestão foi de 1 hora a 37° C (FANEM®, modelo 102, São Paulo, Brasil). Os produtos de digestão foram avaliados em gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia) 1%, corados com brometo de etídio 0,5 µg/mL, tendo como referência padrão de peso molecular de 1 Kb (GIBCO BRL, Life Technologies™, Grand Island, EUA) em cuba de eletroforese horizontal (GIBCO BRL, Life technologies Inc, Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

O produto correspondente ao fragmento *hsp70-gfp* (872 pb) foi purificado utilizando o sistema de purificação de ácidos nucleicos GFX PCR DNA da (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suécia) com descrito no item 3.4.6.

3.6 - Construção do fago recombinante D29::*gfp*

3.6.1 - Reação de ligação dos fragmentos do fago D29 com a *hsp70-gfp*

As reações de ligação foram realizadas com o objetivo de se promover a ligação dos fragmentos do DNA do fago D29 digeridos com *Spe* I com o inserto *hsp70-gfp* para posterior encapsulamento e para isso foi utilizado o protocolo recomendado no kit “Packagene® Lambda Packaging System” (Promega Corporation, Madison, EUA) e “Gigapack® III XL Packaging Extract” (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Várias modificações foram testadas para se otimizar a reação de ligação, como volume e concentração das amostras, temperatura e duração de incubação, incorporação de ATP e glicerina 10%. Desse modo, a reação de ligação foi estabelecida, como exemplo: 2 µL do DNA do fago D29 (10 fmol) foram adicionados a 14 µL do DNA do fragmento *hsp70-gfp* (30 fmol); 4 µL do tampão da ligase 5 x; 1 µL da T4 DNA ligase (Invitrogen, Life Technologies – 1 U/µL) e água Milli-Q qsp 20 µL. A reação foi incubada por 2 horas a 25° C.

Após a reação de ligação foi feito o encapsulamento das partículas dos fagos utilizando-se os protocolos descritos nos conjunto de reagentes “Packagene® Lambda Packaging System” (Promega) e “Gigapack® III XL Packaging Extract” (Stratagene). Um tubo de extrato de empacotamento foi removido do freezer –80° C

e colocado em gelo seco. Após o descongelamento foi adicionado o DNA ligado (item 3.6.1) imediatamente (1 – 4 μ L contendo 0,1 – 1 μ g de DNA ligado). A reação foi incubada a 22° C por 2 horas e em seguida adicionados 500 μ L do tampão SM [5,8 g de NaCl; 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 50 mL de TRIS-HCl 1M (pH 7,5); 5 mL de gelatina a 2% e H_2O deionizada qsp 1.000 mL] e 20 μ L de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha). No sobrenadante contém o fago recombinante pronto para ser titulado.

Os fagos recombinantes foram expandidos e titulados em cultura de *M. smegmatis*. Para isso, uma alçada de *M. smegmatis* mc² 155 foi adicionada e incubada a 37° C, 150 rpm, 16 horas em meio Middlebrook 7H9 acrescido de 0,2 % de glicerina e suplementado com 10% de OADC. Após esse período a suspensão do fago D29 empacotado foi incorporada ao meio por mais 12 horas. Após essa incubação, o meio contendo novas partículas de fago foi centrifugado a 4° C / 10.000 rpm / 10 min. e transferido o sobrenadante para um novo tubo estoque de fago. A titulação do fago recombinante foi realizada de acordo com protocolo anteriormente descrito (item 3.4.2).

3.6.2 - Teste de sensibilidade a antibióticos utilizando-se o fago D29::*gfp*

Para otimizar a técnica em microplaca empregando o D29::*gfp* e avaliar a sua aplicação no teste da CIM, empregou-se a suspensão do fago recombinante em diferentes concentrações e tempo de incubação.

Os procedimentos de preparo das amostras, dos fármacos e montagens das placas foram similares aos realizados no método REMA, conforme previamente

descritos (itens 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3, respectivamente), com a substituição da resazurina pela solução estoque do D29::*gfp*.

RESULTADOS

4.1 – Amostras micobacterianas

Um total de 100 amostras de isolados clínicos do *Mycobacterium* spp foram analisados quanto ao perfil de sensibilidade à H, R, S e E pelos métodos das proporções, CIM pelo método REMA e CIM com D29::gfp.

A figura 8 exemplifica os resultados da CIM de duas amostras de isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como sensibilidade ao fármaco e o desenvolvimento de cor rósea como resistência, pois houve crescimento micobacteriano na presença do fármaco.

Figura 8 – Fotografia de uma placa com 96 orifícios representando a CIM pelo método REMA após revelação com resazurina. A **amostra 1 (nº 82)** tem fenótipo de resistência para H (> ou = 1 µg/mL), R (> ou = 1 µg/mL) e E (> ou = 16 µg/mL) e sensível para S. A **amostra 2 (nº 65)** é resistente a todos os fármacos: H (> ou = 1 µg/mL), R (> ou = 1 µg/mL), S (> ou = 8 µg/mL) e E (> ou = 16 µg/mL).

4.2 - Perfil de sensibilidade aos antimicobacterianos

Os perfis de sensibilidade à H, R, S e E foram avaliados em 100 isolados clínicos utilizando-se os métodos das proporções e REMA.

No **Anexo 1** são mostrados os resultados individuais do teste de sensibilidade a antimicobacterianos dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* identificados pela PCRIS6110. Das 88 amostras de isolados clínicos de *M.tuberculosis*, 25 (28%) isolados foram sensíveis aos quatro fármacos analisados, 19 (22%) foram resistentes aos quatro fármacos analisados e 44 (50%) foram resistentes à pelo menos um fármaco quando avaliados na CIM pelo REMA.

A análise dos resultados pelo método das proporções demonstrou que 19 (22%) isolados clínicos foram sensíveis aos quatro fármacos analisados, 19 (22%) foram resistentes aos quatro fármacos analisados e 50 (56%) foram resistentes à pelo menos um fármaco.

A tabela 1 apresenta os valores do CIM realizado pelo método REMA. Ao considerar o valor de corte de sensibilidade (cut off) para cada antimicrobiano verifica-se que no método REMA identificou 58 (66%) isolados clínicos resistentes à H, 49 (56%) à R, 33 (37,5%) à S e 34 (38,6%) ao E.

Tabela 1. Frequências de valores de CIM pelo REMA para os antimicobacterianos dos isolados clínicos.

CIM (µg/mL)	Isoniazida	Rifampicina	Estreptomicina	Etambutol
≤ 0,015	0% (0)	4,2% (2)	-	-
0,03	5,2% (3)	10,0% (5)	-	-
0,06	5,2% (3)	10,0% (5)	-	-
0,125	5,2% (3)	10,0% (5)	6,0% (2)	-
0,250	10,4% (6)	10,0% (5)	12,0% (4)	0% (0)
0,500	3,0% (2)	35,8% (17)	9,0% (3)	2,9% (1)
> 1,00	71,0% (41)	20,0% (10)	9,0% (3)	6,0% (2)
2,00	-	-	40,0% (13)	6,0% (2)
4,00	-	-	12,0% (4)	9,1% (3)
8,00	-	-	12,0% (4)	20,0% (7)
≥ 16,00	-	-	-	56% (19)
Total	100,0 (58)	100,0 (49)	100,0 (33)	100,0% (34)

Número de isolados clínicos entre parênteses. CIM - concentração inibitória mínima.

Tabela 2 – Resultados comparativos do teste de sensibilidade dos 88 isolados clínicos de *M.tuberculosis* pelos métodos das proporções e REMA.

Método das proporções

REMA	Isoniazida		Rifampicina		Etambutol		Estreptomicina	
	r	s	r	s	r	s	r	s
r	54	4	48	1	30	2	30	3
s	3	27	3	36	1	55	12	43
Total	57	31	51	37	31	57	42	46

Dados representados como número de isolados clínicos. REMA: método em microplaca pela resazurina; r - resistente; s - sensível.

A tabela 2 mostra os resultados comparativos do método das proporções com o REMA para H. Resultados discordantes foram verificados em quatro isolados clínicos sendo sensíveis pelo método das proporções e resistentes pelo REMA. Resultados concordantes para resistência foram verificados em 54 isolados clínicos e 27 isolados clínicos foram sensíveis em ambos os métodos. Três isolados clínicos apresentaram resultados de resistência para o método das proporções e sensíveis no REMA. Para a R, as duas metodologias apresentaram concordância quanto a resistência para 48 isolados clínicos e 36 isolados clínicos mostraram resultados concordantes para a sensibilidade ao fármaco. Resultados discordantes foram verificados em três isolados clínicos que apresentaram resistência no método das proporções e sensíveis no REMA, e apenas um isolado clínico foi sensível no método das proporções e resistente ao REMA. Trinta isolados clínicos foram resistentes ao E pelos dois métodos avaliados e 55 foram sensíveis. Apenas um isolado clínico foi sensível ao REMA e resistente ao método das proporções e dois isolados clínicos foram sensíveis no método das proporções e resistentes no REMA. O teste de sensibilidade a S demonstrou concordância na resistência para 30 isolados clínicos e 44 isolados clínicos para sensibilidade, enquanto 12 isolados clínicos foram sensíveis no REMA e resistente no método das proporções e somente três foram sensíveis no método das proporções e resistentes no REMA.

4.2.1 - Curva ROC obtidas através do programa R

A obtenção da área sob a curva (ASC) se apoiou no método paramétrico conhecido como método da binormal. A partir desse método foram obtidos os p-valores resultantes da comparação da área do REMA com o método das proporções (padrão-ouro).

CURVA ROC ISONIAZIDA

CURVA ROC RIFAMPICINA

CURVA ROC ESTREPTOMICINA

CURVA ROC ETAMBUTOL

Fármaco	ASC (área sob a curva)	p-valor
Isoniazida	0,895	0,0000
Rifampicina	0,868	0,0000
estreptomicina	0,773	0,0000
etambutol	0,965	0,0000

A partir dos p-valores obtidos, pode-se observar significância estatística para todas as áreas obtidas ($p\text{-valor} < 0,05$), ou seja, o método REMA se mostrou uma prova de utilidade. Convém observar, entretanto, que a S se ajustou fracamente, os fármacos H e R apresentaram um bom ajuste enquanto o E apresentou um excelente ajuste.

4.3 – Identificação e caracterização molecular dos isolados clínicos de *Mycobacterium* spp.

4.3.1 - Extração do DNA das micobactérias pela termólise

Figura 9 – Perfis eletroforéticos dos DNAs de *Mycobacterium* spp obtidos pelo método da termólise em agarose a 1% em TBE 0,5 X: **1 e 9** - marcador de tamanho molecular de 1 Kb (Life Technologies - 12.216 / 11.198 / 10.180 / 9.162 / 8.144 / 7.126 / 6.108 / 5.090 / 4.072 / 3.054 / 2.036 / 1.636 / 1.018 / 506.51 pb); **2 – 8 e 10 – 16** - amostras de DNAs de múltiplas cepas de isolado clínico de *Mycobacterium* spp.

4.4 - Resultados da identificação e caracterização molecular dos isolados clínicos

4.4.1 - Identificação do *M. tuberculosis* pela PCR IS6110

Todos os DNAs provenientes dos isolados clínicos foram avaliados na PCR IS6110 para identificar *M. tuberculosis* e as amostras que não amplificaram foram submetidas no PRA *hsp65*.

Oitenta e oito amostras de DNA de isolados clínicos foram confirmadas como sendo *Mycobacterium tuberculosis* pela PCR IS 6110 (VAN EMBDEN *et al.*, 1993) pela amplificação de um produto de 245 pb.

(Anexo 1)

Figura 10 – Perfil eletroforético do produto da PCR correspondente à sequência de inserção IS6110 em agarose a 1% em TBE 0,5 X. O marcador do tamanho molecular de 100 pb (GIBCO BRL – Life Technologies™, Grand Island, EUA) é representado no meio do gel e nas laterais foram adicionados produtos de amplificação.

4.4.2 - Identificação molecular pelo PRA *hsp65*

Doze amostras de DNA de isolados clínicos que não amplificaram na PCR IS6110 foram avaliadas e identificadas pelo PRA *hsp65*. (Quadro 6)

Figura 11 – Perfis eletroforéticos de digestão dos produtos *hsp65* (430 pb) pelas enzimas *Bst* E II e *Hae* III em gel de agarose de 4%. Trilhas M: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 pb. Trilhas 1 a 14 perfis de PRA-*Bst*E II de isolados clínicos. Trilhas 15 a 28: perfis de PRA-*Hae* III.

Tabela 3 - Distribuição relativa das 12 espécies micobacterianas identificadas no PRA *hsp65*

Espécie	Nº de isolados	Porcentual (%)
<i>M. kansasii</i>	7	58,3
<i>M. abscessus</i>	4	33,3
<i>M.szulgai</i>	1	8,4
Total	12	100

Quadro 6 - Resultados de testes de sensibilidade a antimicobacterianos pelos métodos das proporções e REMA de isolados clínicos não *M. tuberculosis* identificados pelo PRA *hsp65*.

Nº da cepa	Nº do Ensaio	Nº da cultura	Método proporções	REMA	Identificação
1*	180/05	2053	H - r R - s S - r E - s	H - r > ou = 1 R - r (0,125) S - r (0,250) E - r > ou = 16	<i>M. szulgai</i>
2*	224/05	2460	H - r R - r S - r E - s	H - r > ou = 1 R - r (0,250) S - s E - r > ou = 16	<i>M. kansasii</i>
3*	238/05	2621	H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r > ou = 1 S - r > ou = 8 E - r > ou = 16	<i>M. abscessus</i>
4*	306/05	3642	H - r R - s S - r E - r	H - r > ou = 1 R - s S - r (0,5) E - R > ou = 16	<i>M. kansasii</i>
5*	306/05	3661	H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r (0,125) S - r (2) E - r > ou = 16	<i>M. kansasii</i>
6*	318/05	3760	H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r (0,125) S - r (2) E - r > ou = 16	<i>M. kansasii</i>
7*	326/05	3831	H - r R - r S - r E - r	H - r (0,5) R - r (0,125) S - r (2) E - r (4)	<i>M. kansasii</i>
8*	326/05	4607	H - r R - r S - r E - r	H - r (0,5) R - r (0,25) S - r (4) E - r (4)	<i>M. kansasii</i>
9*	351/05	4532	H - r R - s S - r E - s	H - r (0,125) R - s S - r (2) E - s	<i>M. kansasii</i>
10*	368/06	4701	H - r R - r S - s E - r	H - r (0,06) R - r (0,5) S - s E - r > ou = 16	<i>M. abscessus</i>
11*	386/06	4785	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M. abscessus</i>
12*	37/06	616	H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r > ou = 1 S - r > ou = 8 E - r > ou = 16	<i>M. abscessus</i>

Siglas = H - isoniazida, R - rifampicina, S - estreptomicina, E - etambutol, s - sensível, r - resistente.

4.4.3 – Caracterização molecular dos isolados de *M.tuberculosis* pela técnica do MIRU

Para cada conjunto de iniciadores foram obtidos produtos da PCR de tamanho variável de acordo com o número de unidades de repetição de cada locus (1 a 12). Os perfis de MIRU foram obtidos consultando-se uma tabela que relaciona o tamanho do produto de PCR com o número de alelos (unidades de repetição) (MAZARS *et al.*, 2001). Estes resultados foram utilizados na construção de outras tabelas, as quais foram empregadas na geração de dendrogramas, com a utilização de análise filogenética. Na figura 12 estão representados os perfis de MIRU do locus 2 (MIRU-2) para diversos isolados clínicos de *M.tuberculosis*.

Figura 12 – Perfis eletroforéticos de MIRU-2 das amostras de DNA de *M.tuberculosis* em gel de agarose a 2%. Trilhas M1 e M2: marcadores de tamanho molecular de DNA de 50 e 100 pb, respectivamente. Trilhas 1 a 28: perfis de MIRU-2 de diversas amostras de DNA.

No quadro 7 são apresentados os resultados dos perfis de MIRU de isolados clínicos de *M. tuberculosis* identificadas pela técnica de PCR IS6110.

Quadro 7 - Perfis de MIRU de isolados clínicos de *M. tuberculosis* identificados pela PCR IS6110 com amplificação de 12 loci

Nº amostra MIRU	02	04	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
4	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1
21	2	2	6	1	2	5	1	5	3	3	2	3
22	2	2	3	7	2	6	1	4	2	3	2	1
25	1	2	4	3	2	6	1	4	3	3	2	4
29	1	2	5	3	2	6	1	3	3	3	2	4
31	2	2	4	3	2	6	1	4	3	3	2	1
38	1	2	4	4	2	5	1	5	4	2	2	4
39	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	3
45	1	2	4	3	2	6	1	3	3	4	2	4
47	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	3
49	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	2
50	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	2
54	1	2	5	3	2	6	1	3	3	3	2	4
55	2	2	5	4	2	5	1	6	0	2	2	3
57	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
66	2	2	5	3	2	6	1	4	3	3	2	3
69	2	2	4	2	1	6	1	4	3	2	2	8
70	2	2	4	1	2	5	1	5	2	2	2	1
71	2	2	4	1	2	5	1	5	2	2	2	1
84	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	4
89	1	2	4	3	2	7	1	5	3	2	2	2
97	1	2	4	3	2	7	1	3	3	3	2	4
99	2	2	2	4	2	6	1	5	4	3	2	2
100	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
101	2	2	4	2	2	5	1	2	3	3	2	1
102	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3
137	1	2	4	3	1	3	1	5	3	6	2	3

Nº amostra MIRU	02	04	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
152	1	2	4		2	6	1		3	3	2	6
226	2	2	3	1	1	5	1	2	2	3	1	1
235	2	2	4	1	1	5	1	2	2	3	1	1
243	1	2	3	3	2	2	1	3	3	2	2	4
250	2	2	3	7	2	6	1	4	2	3	2	1
251	2	2	2	3	2	3	1	8	3	3	2	3
252	1	2	4	3	2	6	1	4	3	3	2	4
253	2	2	5	2	1	3	1	5	3	3	2	3
264	2	2	3	1	2	6	1	5	2	3	2	1
287	1	2	4	4	2	5	1	5	4	2	2	4
314	2	2	3	3	2	5	1	4	3	4	2	4
352	1	2	3	4	2	6	1	5	3	3	2	3
362	2	2	3	3	2	6	1	4	3	4	2	3

Na figura 13 está apresentado o dendrograma obtido a partir dos resultados de MIRU descritos no quadro 8.

O dendrograma mostra 39 perfis diferentes de MIRU. As amostras 70 e 71 mostraram similaridade entre si assim como as amostras 49 e 50.

Figura 13. Dendrograma obtido após análise dos dados do MIRU das amostras de DNA de *M. tuberculosis*. As amostras 49 - 50 e 70 - 71 são da mesma origem, podendo indicar infecção recente ou transmissão. Outros cinco clusters com 93 a 95% de similaridade foram formados (4 e 31, 57 e 100, 25 e 45, 39 e 47, 66 e 102).

No quadro 8 são apresentados os resultados dos perfis de MIRU de cepas de *M. tuberculosis* identificadas apenas com 11 loci, que não nos permitiu a construção do dendrograma, pois o programa não aceita com um número inferior a 12 loci.

No entanto verifica-se visualmente a presença de cepas com origens diferentes.

Quadro 8 - Perfis de MIRU de cepas de *M. tuberculosis* identificadas pela PCR IS6110 com amplificação de 11 loci.

Nº amostra MIRU	02	04	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
89		2	4	2	2	6	1	2	3	3	2	1
137	1	2		3	1	3	1	5	3	6	2	3
251	2	2		3	2	3	1	8	3	3	2	3
252	1	2	4	3	2		1	4	3	3	2	4
367	2		4	3	2	6	1	4	3	3	2	1
371	2	2	3	3	2		1	5	3	3	2	2
372	1	2	3		1	6	1	3	3	4	2	3
373	2	2		3	2	5	1	4	2	2	2	1
374	2	2		1	2	6	1	4	2	2	2	1
394	2	2	2		2	6	1	5	2	3	2	1
01/06	2	2	3	1	2	5	1	4	3	3	2	4
02/06	2	2	4		1	3	1	5	3	3	2	3
04/06	2	2	5	3	1		1	4	4	3	2	3

4.5 – Experimentos com fago D29

4.5.1- Expansão do fago D29 em meio líquido (Middlebrook 7H9)

Os fagos foram expandidos em *M. smegmatis* com a finalidade de se manter um estoque razoável para posterior extração do DNA. Essa técnica foi otimizada testando vários volumes (5 – 50 mL) de meio de cultura (7H9) e variações no tempo de incubação (12 – 24 horas) com posterior titulação das respectivas amostras. O volume final do estoque de fago D29 ao utilizar esse protocolo foi superior a 50 mL. As fotografias a seguir exemplificam duas placas de petri de 150 mm

correspondentes a uma diluição seriada de um estoque de fago D29 onde o título foi de 10^{-120} .

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Figura 14 – Fotografias de placas de petri da titulação do fago D29.

Painel A - diluição de 10^{-1} a 10^{-43} e painel B – representando a diluição de 10^{-85} a 10^{-120} .

4.6 - Extração do DNA do fago D29

Dois protocolos foram empregados para extração de DNA do fago D29, um pelo método descrito segundo SAMBROOK & RUSSEL., 2001 e um outro com um produto comercial da Promega; o kit “wizard lambda Preps DNA purification system”.

A fotografia a seguir representa os diferentes perfis da corrida eletroforética do DNA extraído do estoque de fago D29 empregando os dois protocolos.

Figura 15 – Perfil eletroforético do DNA do fago D29 em gel de agarose a 1 %, em TBE 0.5 X durante a otimização da etapa de extração : **1** - marcador de 1 Kb (Life Technologies - 12.216 / 11.198 / 10.180 / 9.162 / 8.144 / 7.126 / 6.108 / 5.090 / 4.072 / 3.054 / 2.036 / 1.636 / 1.018 / 506.51 pb); **2, 3 e 7** – DNAs extraídos pelo método fenol/ clorofórmio; **4, 5, 6** – DNAs extraído pelo kit da Promega.

4.6.1 - Reação de digestão do DNA do fago D29 pela *Spe I*

De acordo com estudo bioinformático com dados do Gen Bank e do programa Primer Premier ® v.5,0, a enzima *Spe I* cliva o DNA do fago D29 em duas regiões no genoma, produzindo três fragmentos com os seguintes tamanhos:
- 38.320, 9.971 e 845 pb, sendo que esse último sítio de restrição enzimática está localizado em uma região intergênica.

As fotografias a seguir representam os diferentes perfis eletroforéticos dos fragmentos de DNA do fago D29 extraídos com kit da Promega e digerido pela *Spe I*.

A separação eletroforética foi realizada a 100 V, 60 mV por 1 hora, empregando fonte modelo EPS 200 em cuba de eletroforese horizontal (GIBCO BRL).

Figura 16 – Perfis eletroforéticos do DNA do fago D29 (49 Kb) digerido pela *Spe* I, em diferentes protocolos de digestão enzimática, em gel de agarose a 1 %, TBE 0.5 X: **1** - marcador de 1 Kb (Life Technologies - 12.216 / 11.198 / 10.180 / 9.162 / 8.144 / 7.126 / 6.108 / 5.090 / 4.072 / 3.054 / 2.036 / 1.636 / 1.018 / 506.51 pb); **2** – DNA do fago D29 não digerido; **3** - produto de digestão DNA do fago D29 com *Spe* I (**digestão parcial – 30 min.**); **4** - produto de digestão DNA do fago D29 com *Spe* I (**digestão de 1 hora**); **5** - produto de digestão DNA do fago D29 com *Spe* I (**digestão de 4 horas**); **6** – fragmento *hsp70-gfp* produzido pela PCR e **7** – marcador de 50 pb.

4.6.2 - Eletroforese em campo pulsado

Para se confirmar o tamanho dos fragmentos de DNA do fago D29 após reação de digestão com *Spe* I, a corrida eletroforética em campo pulsado foi otimizada empregando como marcador de tamanho molecular Lambda DNA-Mono cut Mix da (BioLabs Inc, New England). Várias concentrações de gel de agarose (0,8 a 1,5 %) foram testadas em diferentes tempos de corrida eletroforética (20 a 5 horas). Desse modo, a eletroforese em campo pulsado ficou otimizada para uso em gel de agarose 1% com TBE 0,5 x / 6 V/cm / 15 ° C / troca de tempo 0,5 – 1,5 seg / tempo de corrida de 6 horas.

Figura 17 – Perfis eletroforéticos em campo pulsado do DNA do fago D29 digerido pela *Spe* I em agarose 1% com 8 horas de corrida: **1** - marcador de tamanho molecular – Lambda DNA (48.502 /38.416 /33.498 /29.946 /24.508 /23.994 /17.053 /15.004 / 10.086 /1.503 pb); **2** – amostra do DNA do fago D29 sem digestão enzimática / **3 a 8** – produtos da digestão do DNA do fago D29 com *Spe* I .

Figura 18 – Perfis eletroforéticos em campo pulsado do DNA do fago D29 digerido pela *Spe* I em gel de agarose 1%, TBE 0,5 x / 6 V/cm / 15 ° C / troca de tempo 0,5 – 1,5 seg / tempo de corrida de 15 horas: **1** - marcador de tamanho molecular – Lambda DNA (48.502 /38.416 /33.498 /29.946 /24.508 /23.994 /17.053 /15.004 / 10.086 /1.503 pb); **2 e 4** - amostras do DNA do fago D29 sem digestão enzimática; **3 e 5** – diferentes perfis de fragmento do DNA do fago D29 após digestão com *Spe* I.

Figura 19 – Perfis eletroforéticos dos fragmentos do DNA do fago D29 purificados pelo Kit GFX PCR DNA da GE Amersham Bioscience. Fotografia de gel de agarose 1%, TBE 0,5X: **1** - marcador de 1 Kb (Life Technologies - 12.216 / 11.198 / 10.180 / 9.162 / 8.144 / 7.126 / 6.108 / 5.090 / 4.072 / 3.054 / 2.036 / 1.636 / 1.018 / 506.51 pb); **2** – produto de purificação correspondente ao fragmento 38.320 Kb; **3, 5 e 7** - produto de purificação correspondente ao fragmento 9.971 Kb; **4, 6 e 8** - produto de purificação correspondente ao fragmento 845 pb.

Como uma estratégia auxiliar, uma PCR foi padronizada e otimizada para amplificar o fragmento de 845 pb na extremidade coesiva direita no mapa genético do fago D29. Esse fragmento de DNA não era visível no gel de agarose após digestão do fago D29 com *Spe* I ou quando presente tinha aspecto difuso e irregular. Para esse propósito foi analisada a sequência disponível (número de acesso NC 001900, gi 9630386) no Banco de genes (Gen Bank) e a construção dos oligonucleotídeos iniciadores empregando o programa Primer Premier® v.5,0

Figura 20 – Perfil eletroforético do fragmento de 845 pb do DNA do fago D29 amplificado pela PCR e digerido pela *Spe I* em gel de agarose 1%, TBE 0,5 X: 1 - marcador de tamanho molecular de 1 Kb (Life Technologies - 12.216 / 11.198 / 10.180 / 9.162 / 8.144 / 7.126 / 6.108 / 5.090 / 4.072 / 3.054 / 2.036 / 1.636 / 1.018 / 506.51 pb); 2 - produto de digestão do fragmento de 845 pb.

Quadro 9 - Resultados referentes às densidades óticas (D.O) dos DNAs correspondentes aos fragmentos do fago D29 purificados com kit GFX PCR DNA da Amersham Pharmacia Bioscience

Amostra	data	230	260	280	260/280	260/230	Ng/uL
1 – 9 Kb am.8	10.03.06	1.056	-0.636	-0.105	6.07	0.60	-31.8
2 – 9 Kb am.4	20.04.06	0.789	-0.350	0.033	-10.75	-0.44	17.5
3 – 9 Kb am.12	27.04.06	-0.483	-0.590	-0.062	9.47	1.22	29.5
4 – 9 Kb am.14	27.04.06	-0.607	-0.312	0.108	-2.89	0.51	-15.6
5 – 9 Kb am.15	07.05.06	-1.564	-0.688	-0.158	4.36	0.44	-34.4
6 – 9 Kb am.16	07.05.06	-1.190	-0.502	-0.020	25.32	0.42	-25.1
7 – 9 Kb am.17	18.05.06	8.889	0.836	0.492	1.70	0.09	41.8
8 – 9 Kb am.18	18.05.06	0.727	1.238	0.455	2.72	1.70	61.9
9 – 9 Kb	21.06.06	11.56	0.517	0.367	1.41	0.04	25.8
10 – 9 Kb am.12	22.09.06	2.90	0.726	2.62	2.77	0.25	36.3
11 – 9 Kb am.2	05.01.07	7.678	0.182	0.132	1.38	0.02	9.1
12 – 9 Kb am.1	22.02.07	-0.466	-0.015	0.024	-0.61	0.03	-0.7
13 – 9 Kb am.2	22.02.07	3.372	0.287	0.223	1.29	0.08	14.3
14 – 9 Kb	09.03.07	11.85	0.152	0.071	2.15	0.01	7.6
15 – 9 Kb	17.03.07	0.130	0.280	0.178	1.57	2.15	14.0
16 – 9 Kb	28.03.07	4.089	0.017	0.019	0.88	0.00	0.9
17 – 9 Kb	28.03.07	7.838	0.655	0.459	1.43	0.008	32.8
18 – 9 Kb	28.03.07	11.86	0.076	0.046	1.63	0.01	3.8
19 – 9 Kb	28.03.07	11.38	0.043	0.026	1.69	0.00	2.2
20 – 9 Kb	03.04.07	8.019	1.851	1.248	1.48	0.23	92.6

Amostra	data	230	260	280	260/280	260/230	Ng/uL
1 – 38 Kb am.4	20.04.06	2.445	0.412	0.97	2.09	0.017	20.6
2 – 38 Kb am.12	27.04.06	0.720	0.094	0.023	1.16	0.3	4.7
3 – 38 Kb am.14	27.04.06	0.582	0.088	0.026	3.43	0.15	4.4
4 – 38 Kb am.15	07.05.06	0.481	0.452	0.304	1.49	0.92	22.6
5 – 38 Kb am.16	07.05.06	-0.078	0.105	0.055	1.92	-1.35	5.3
6 – 38 Kb am.18	18.05.06	7.367	0.123	0.029	4.30	0.02	6.1
7- 38 Kb	30.06.06	4.059	0.153	0.063	2.42	0.04	7.6
8- 38 Kb	22.09.06	-0.348	1.200	0.243	4.93	-3.45	60
9 – 38 Kb	05.01.07	-0.287	0.017	-0.003	-5.41	0.06	0.9
10 – 38 Kb	22.02.07	-0.078	0.006	-0.059	-0.10	-0.08	0.3
11 – 38 Kb	22.02.07	-0.269	0.019	-0.018	-1.09	-0.07	1
12 – 38 Kb	09.03.07	0.979	0.063	0.017	3.70	0.06	3.1
14- 38 Kb	28.03.07	3.793	0.078	0.043	1.82	0.02	3.9
15- 38 Kb	28.03.07	6.093	0.045	0.031	1.43	0.01	2.3
16- 38 Kb	28.03.07	10.28	0.044	-0.003	-15.4	-	2.2
17- 38 Kb	30.03.07	10.56	0.543	0.293	1.85	0.05	27.1
18- 38 Kb	15.04.07	6.126	0.245	0.248	0.99	0.04	12.3
19- 38 Kb	17.04.07	4.553	0.226	0.142	1.58	0.05	11.3

4.7 - Produção do fragmento hsp70-gfp pela PCR

O pYL GFP tem inserido no seu sítio de múltipla clonagem o promotor da hsp70 e o gene da proteína verde fluorescente (*gfp*) e este plasmídeo foi empregado como o DNA molde para a PCR (LUO *et al.*, 2000).

Figura 21 – Perfis eletroforéticos dos produtos de PCR correspondentes às regiões que flanqueiam o promotor hsp70 e o gene da proteína verde fluorescente inseridos no pYL GFP em gel de agarose 1%, TBE 0,5 X: **1** - marcador de tamanho molecular de 1 Kb (Life Technologies) ; **2 – 7** - fragmentos correspondentes ao produto de PCR do hsp70-*gfp* (872 pb) inseridos no pYL GFP.

4.7.1 - Digestão enzimática do fragmento *hsp70-gfp* pela *Spe* I

Os produtos da PCR correspondentes ao fragmento *hsp70-gfp* foram submetidos à reação de digestão pela *Spe* I para posterior ligação com os fragmentos do DNA do fago D29 pela ação da T4 DNA ligase.

Figura 22 – Perfis eletroforéticos dos produtos de digestão dos fragmentos de DNA que flanqueiam o promotor *hsp70-gfp* em gel de agarose 1%, TBE 0,5 X: 1 - marcador de tamanho molecular de 1 Kb (Life Technologies - 12.216 / 11.198 / 10.180 / 9.162 / 8.144 / 7.126 / 6.108 / 5.090 / 4.072 / 3.054 / 2.036 / 1.636 / 1.018 / 506.51 pb); 2 e 4 – produtos de PCR correspondentes ao fragmento *hsp70-gfp*; 3 e 5 – produto da digestão dos respectivos fragmentos *hsp70-gfp* com *Spe* I por 1 hora a 37° C.

4.8 - Reação de ligação dos fragmentos correspondentes aos DNA do fago D29 com *hsp70-gfp*

As bandas correspondentes aos fragmentos de 38.320, 9.971 e 845 pb do fago D29 após digestão com *Spe* I foram cortadas dos géis de agarose e purificadas pelo kit GFX PCR DNA. No entanto, as reações de ligação desses fragmentos com *hsp70-gfp* ficaram comprometidas por causa do baixo rendimento de DNA desses

fragmentos após purificação. Várias reações de ligação foram conduzidas, alterando os volumes de cada fragmento e sua respectiva concentração.

Uma outra estratégia foi purificar os fragmentos de DNA do fago D29 diretamente do tubo após a reação de digestão com *Spe* I, sem a necessidade de separação em corrida eletroforética com posterior purificação das bandas no gel de agarose. Esse produto purificado foi ligado ao fragmento *hsp70-gfp* pela ação da T4 DNA ligase e a reação de encapsulamento foi realizada na sequência.

4.8.1 - Expansão do fago D29 em *M. smegmatis* após a reação de encapsulamento empregando os extratos fornecidos pela Packagene® e Gigapack®.

As soluções fágicas resultantes das diversas reações de encapsulamento foram expandidas em 5 mL de *M. smegmatis* m² 155 em fase logarítma de crescimento para expansão do fago recombinante.

Figura 23 – Padrão de fluorescência da solução de *M. smegmatis* antes da transfecção com fago (superior) e após incubação com o fago D29 encapsulado (inferior). A visualização da solução de *M. smegmatis* foi realizada sob luz UV e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400.

4.9 - Determinação da CIM empregando o D29::*gfp* como agente revelador

As placas foram montadas seguindo o esquema representado na figura 6 de Material e Métodos (item 3.2.3).

Figura 24 – Placa de microdiluição com 96 orifícios montada de acordo com o protocolo REMA e empregando o fago D29::*gfp* como agente revelador.

As amostras de isolados clínicos foram testadas com o D29::*gfp*, empregando com padrão ouro o método das proporções e REMA para avaliar a sensibilidade do teste e sua especificidade. A emissão de fluorescência ocorreu de forma intensa, porém inespecífica quando comparada ao REMA, não demonstrando reprodutibilidade e correlação nessas mesmas amostras. Verifica-se no orifício a partir do número sete na horizontal uma fluorescência para os verticais a partir do número 2 a 8, no entanto os valores destas mesmas amostras pelo REMA não foram concordantes. Mostrando inespecificidade na emissão da fluorescência que foi semelhante em todas as amostras de diferentes perfis de resistência.

DISCUSSÃO

5 – Discussão

O diagnóstico da tuberculose é realizado pela baciloscopia através da pesquisa direta do BAAR (bacilo álcool-ácido resistente), cultura do espécime clínico, isolamento e identificação bioquímica do bacilo. O teste de sensibilidade aos fármacos empregados no tratamento dessa infecção é também realizado nos centros de referência que possuem condições adequadas de manipulação de culturas de micobactérias (BRASIL, 2005).

A tuberculose é um grave problema de Saúde Pública e o tratamento com quimioterápicos específicos está sendo dificultado devido à presença das cepas multidrogas resistentes (COKER, 2004). Nas infecções bacterianas um teste rápido para detecção, identificação e de determinação de sensibilidade é fundamental para melhorar a eficácia terapêutica. Como o *M. tuberculosis* é um microrganismo de crescimento lento (28 dias), novas técnicas têm sido desenvolvidas com o objetivo de reduzir o tempo, principalmente nos testes de sensibilidade, evitando desse modo, a prescrição inadequada de medicamentos.

O procedimento terapêutico atual é de eficácia comprovada na cura da tuberculose, quando cumprido adequadamente. No entanto, observam-se falhas significativas e o índice de abandono é bastante significativo e este é o principal responsável pelo surgimento ou seleção de cepas com resistência aos quimioterápicos utilizados (FIÚZA DE MELO & AFIÚNE, 1993).

Os isolados clínicos de *M. tuberculosis* neste estudo foram provenientes do Instituto Clemente Ferreira (ICF), onde o escarro dos pacientes foi tratado pelo método Petroff, uma vez que a flora associada, por se desenvolver muito mais

rapidamente e contaminaria o meio de cultura dificultando assim o isolamento de micobactérias. Os isolados clínicos com crescimentos suficientes após 28 dias foram semeados em L-J com antibióticos para a realização do teste de sensibilidade aos antibacilares pelo método das proporções (CANETTI *et al.*, 1963). O ICF realizou esse teste de sensibilidade para a H, R, S e E.

Os resultados do método das proporções foram gentilmente disponibilizados pelo ICF e os respectivos tubos de L-J sem antibióticos foram reservados para a realização do REMA. Essa etapa do projeto foi realizada no Laboratório de Micobactérias do ICF, de acordo com a disponibilidade dos isolados clínicos. O alamar blue é um corante que foi padronizado para ser empregado como agente revelador no MABA e foi utilizado em outros projetos relacionados à determinação da CIM para H e Z em microplacas (CARDOSO, 2003; CARDOSO *et al.*, 2004; BARCO, 2004 e BARCO *et al.*, 2006) técnica essa descrita por COLLINS & FRANZBLAU *et al.*, 1997. Atualmente o alamar blue não é mais distribuído no Brasil, mas um outro reagente, a resazurina que é o princípio ativo do alamar blue, tem sido proposto para a sua substituição. PALOMINO *et al.*, 2002 descreveram o método REMA analisando 80 amostras de isolados clínicos resistentes a R e H e os resultados foram comparados com o método das proporções demonstrando ser uma técnica sensível, específica, simples, rápida e de baixo custo.

Os isolados clínicos provenientes do escarro de pacientes com suspeita de tuberculose foram avaliados quanto a sensibilidade a H, R, E e S utilizando o método das proporções e REMA.

Fazendo uma análise nas divergências dos resultados entre os métodos das proporções e REMA para a H verificou-se que quatro isolados clínicos foram

sensíveis pelo método das proporções e resistentes no REMA, com três isolados clínicos resistentes pelo método das proporções e sensíveis no REMA. Ao analisar a R, verificou-se que três isolados clínicos foram resistentes pelo método das proporções e sensíveis pelo REMA e apenas um isolado clínico foi sensível no método das proporções e resistente no REMA. O fármaco E apresentou discordância entre dois isolados clínicos que foram sensíveis pelo método das proporções e resistente pelo REMA, mas somente um isolado clínico foi sensível no REMA e resistente no método das proporções. Para a S foi verificado que três isolados clínicos foram sensíveis no método das proporções e resistente no REMA e 12 isolados clínicos foram resistentes no método das proporções e sensíveis no REMA.

Um total de 26% dos isolados clínicos (23/88) apresentou discordância em apenas um fármaco, 1,1% (1/88) em dois fármacos e 1,1% (1/88) nos quatro fármacos analisados.

Estudos semelhantes têm sido descritos e NATECHE *et al.*, 2006 avaliaram 136 isolados clínicos de *M. tuberculosis* empregando o método das proporções e REMA e concluiu que o REMA é uma técnica rápida e sugeriu a sua utilização em países em desenvolvimento com alta frequência de cepas multidroga resistentes. Resistência a pirazinamida foi avaliada pelo REMA e comparado com o BACTEC 460 TB determinando uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98% (MARTIN *et al.*, 2006). BARCO *et al.* 2006 avaliou isolados clínicos resistentes à Z empregando o MABA, que é similar a REMA e para discriminar as cepas utilizou a técnica de “spoligotyping”.

Na população brasileira, as resistências aos fármacos antituberculose estão relacionadas ao uso irregular da medicação, a alta taxa de abandono do tratamento de muitos pacientes ainda com a doença ativa e também pelas prescrições inadequadas. Um estudo foi desenvolvido em um Centro de Referência na cidade de São Paulo para avaliar as taxas de resistência aos fármacos entre as décadas de 60 a 90 e foi verificado um aumento na taxa total de 7,4% na década de 80 e de 17% na década de 90, valores comparáveis aos obtidos na década de 60 (FIÚZA de MELO *et al.*, 2000).

A tuberculose resistente a múltiplos fármacos é internacionalmente definida como resistência a pelo menos, H e R, podendo ou não haver resistência a outros fármacos (DAVIES, 1999). No Brasil, no entanto, o conceito de multidroga resistente refere-se aos casos que apresentam falência no tratamento com a utilização do esquema III, preconizado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose, ou quando o bacilo é resistente a H e R e ainda a mais um dos fármacos normatizados (FIÚZA DE MELO *et al.*, 2003). No Brasil, um estudo demonstrou que a taxa de resistência primária, ou resistência ao fármaco entre casos novos é de 3,8 % para H, 0,2 % para R isoladamente e de 0,9% para esses dois fármacos simultaneamente. Quanto à resistência secundária ou resistência aos fármacos entre pacientes previamente tratados, registrou-se 4,2 % para H, 0,6% para R e 5,9% para as duas simultaneamente (ROSEMBERG, 1999).

A identificação dos isolados clínicos (100) foi realizada pelo perfil bioquímico. A identificação por metodologia molecular dos isolados clínicos de *Mycobacterium* spp foi realizada inicialmente empregando a PCR da sequência IS6110 (VAN EMBDEN *et al.*, 1993) para todos os isolados clínicos para identificação e

confirmação do *M. tuberculosis*. Oitenta e oito isolados clínicos foram avaliados e identificados pela PCR IS6110 como sendo *M. tuberculosis* (**anexo 1**) e as amostras que não foram possíveis de serem identificadas, posteriormente foram avaliadas pelo PRA *hsp65* (TELENTI *et al.*, 1993a) para identificação do gênero *Mycobacterium* (**Quadro 6**). O resultado desta identificação levou a um isolado clínico que foi identificado como *M. szulgai* (nº 1*); sete foram identificados como *M. kansasii* (nº 2*; 4*; 5*; 6*; 7*; 8* e 9*) e quatro como sendo *M. abscessus* (nº 3*; 10*; 11* e 12*) após realização do PRA *hsp65*, mostrando eficácia suficiente para o presente estudo. De tal forma que todos os isolados foram caracterizados adequadamente (PCR IS6110 e PRA *hsp65* (VAN EMBDEN *et al.*, 1993 e TELENTI *et al.*, 1993a).

As amostras de isolados clínicos utilizadas neste estudo tiveram o perfil epidemiológico molecular avaliado pela reação de MIRU. A maioria dos isolados foi adequadamente classificada e distinta, exceto as amostras 49 - 50 e 70 - 71 que foram de “clusters” da mesma origem. Estes casos podem indicar infecção recente/transmissão.

Ainda podem ser verificados cinco “clusters” com cerca de 93 a 95% de similaridade também formados por dois indivíduos - “cluster” (4 e 31, 57 e 100, 25 e 45, 39 e 47, 66 e 102). Nestes “clusters” a variação ocorreu em um ou até três loci, sendo que na maioria, a diferença foi de apenas um VNTR (“variable numbers of tandem repeats”). Estes casos podem também caracterizar infecção recente, mas tem que analisar em conjunto com os dados de epidemiologia clássica, uma vez que houve pequenas mutações, mas não era o objetivo da presente pesquisa.

Os perfis foram agrupados em dois grandes grupos que foram denominados de I e II, sendo o primeiro com cerca de 40% de similaridade contendo um “cluster” e 15 perfis diferentes. O segundo com cerca de 30% compreendeu um “cluster” e 24 perfis diferentes. É interessante notar que nitidamente dois grupos foram caracterizados de forma clara, sendo que o grupo II é o mais antigo.

Esta estratégia do MIRU é utilizada para discriminar os isolados e consiste em um sistema altamente reprodutível e rápido com a geração de genótipos confiáveis baseados no estudo detalhado de 12 loci contendo VNTRs do genoma do *M. tuberculosis*. Essa técnica permite uma comparação de linhagens entre diferentes áreas geográficas e monitorização da movimentação de linhagens individuais. Esses dados são de grande importância no estudo da transmissão global da tuberculose e na identificação de linhagens com propriedades particulares, como alta infectividade, virulência e resistência aos fármacos (SUPPLY *et al.*, 2001; SOLA *et al.*, 2003 e THORNE *et al.*, 2007).

A simplicidade e a facilidade das técnicas em biologia molecular têm proporcionado que novos testes de sensibilidade aos medicamentos tenham sido desenvolvidos (ARAIN *et al.*, 1996; ELTRINGHAM *et al.*, 1999a; McNERNEY *et al.*, 2004). ANDREW & ROBERTS, 1993 demonstraram que o *M. smegmatis* transformados por eletroporação com o plasmídeo pMV261 podiam expressar a luciferase e descreveram um método para medir a atividade antimicobacteriana através da bioluminescência, após adição da luciferina. ARAIN *et al.*, 1996 empregando cepas recombinantes de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. avium* e *M. intracellulare* padronizaram um teste de CIM empregando a luciferase e compararam o resultado com teste BACTEC, demonstrando que essa nova

metodologia poderia ser otimizada para análises de novos fármacos. Um outro estudo foi desenvolvido empregando *M. tuberculosis* transformados com um plasmídeo contendo o gene da luciferase e essa bactéria foi avaliada quanto ao perfil de sensibilidade a novas drogas sintéticas ou extratos vegetais com potencial atividade anti-tuberculose (SATO, 2003).

As pesquisas realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP têm sido pioneiras no Brasil ao estudar os genes de resistência para os fármacos utilizados para o tratamento da tuberculose. CARDOSO *et al.*, 2004 descreveram 26 novas mutações no gene *KatG* que ainda não tinham sido descritas e estudaram os genes *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC* relacionados a resistência à H. Um outro estudo descreveu a caracterização molecular das mutações no gene *pncA* responsável pela resistência à Z e concluiu que a mutação nesse gene sugeria ser o principal mecanismo de resistência nos isolados clínicos brasileiros, além de ter sido identificadas nove mutações ainda não descritas na literatura, sugerindo a influência de fatores regionais nos perfis de mutação à Z (BARCO, 2004 e BARCO *et al.*, 2006). A mutação no gene *rpoB* correlacionada a resistência à R foi também estudada utilizando a CIM empregando o fago D29 como revelador da resistência, sendo que esses resultados foram comparados com o método MABA (CAMPOS, 2001).

O fago D29 é um fago lítico capaz de infectar as principais micobactérias de interesse clínico. Um estudo recente avaliou 14 micobacteriófagos, entre eles o D29 utilizando-os em teste de replicação do micobacteriófago. Sete micobactérias, incluindo a *M. ulcerans* e *M. tuberculosis* foram infectadas, demonstrando ao final da

técnica a aplicação desses fagos nos testes de sensibilidade aos fármacos (RYBNIKER *et al.*, 2006).

Utilizando-se da experiência adquirida em manipulação de *M. tuberculosis* e em técnicas de biologia molecular, o atual projeto de pesquisa propôs a construção do fago recombinante D29::*gfp* inserindo o promotor da *hsp70* micobacteriana e o gene *gfp* em uma região não essencial no DNA do fago D29. A incorporação do gene da proteína verde fluorescente neste fago pode ser uma ferramenta de medida de atividade biológica pela emissão de luz sem a necessidade de co-fatores ou de substratos apenas necessitando de um equipamento bastante comum no laboratório clínico; a leitora de ELISA.

A parte experimental do projeto teve início com a reativação e expansão do fago D29. O fago D29 foi empregado em um estudo que avaliou o teste de replicação do fago e validou os resultados obtidos com a cultura em L-J, apresentando 44,1% de sensibilidade, 92,6% de especificidade, 82,2% de valor preditivo positivo e 67,5% de valor preditivo negativo. Nesse estudo o fago D29 foi expandido em meio líquido (7H9 com OADC) e após titulação, altos títulos de fago D29 na suspensão fágica foram observados (McNERNEY *et al.*, 2004) e o referido protocolo foi adotado no atual projeto (**Figs. 14 A e 14 B**).

A estratégia escolhida para a extração do DNA foi a lise do envelope utilizando proteinase K e SDS com purificação com fenol e clorofórmio, seguida pela precipitação do DNA com etanol (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Esse método manipula substâncias tóxicas (fenol e clorofórmio), apresenta várias etapas de incubação e centrifugação com um volume final de no máximo de 30 µL com baixa concentração de DNA. Para se testar um outro método que apresentasse um

melhor rendimento, o kit “wizard lambda Preps DNA purification system” da Promega foi adquirido e foi utilizado, diferindo do método da proteinase K por apresentar uma mistura de nuclease contendo RNAase. O protocolo requer um volume de 10 mL da suspensão fágica e conseqüentemente apresenta uma maior concentração de DNA no final do processo de extração, mas apresenta um custo elevado e permite no máximo vinte reações por kit.

Para escolher a enzima de restrição capaz de clivar o DNA do fago D29 em uma região intergênica um estudo de bioinformática foi realizado utilizando-se de dados armazenados no Gen Bank (NC – 001900 / gi 9630386) e primer premier 3 para localizar os sítios de enzima de restrição. Essa região foi escolhida com base em um estudo de sequenciamento e identificação dos genes do fago D29 (FORD *et al.*, 1998). De fato essa região intergênica próxima ao final coesivo foi descrita como não essencial e PEARSON *et al.*, 1996 demonstraram ser possível inserir o gene que codifica a luciferase em uma região intergênica próxima ao final coesivo direito do mapa genético do fago D29 e demonstrou que a expressão da luciferase ocorria sem interferir no processo de encapsulamento do fago D29.

Todas as regiões intergênicas foram analisadas e o sítio para a enzima *Spe I* foi o único que estava presente somente em uma região intergênica próxima ao final coesivo direito do mapa genético. Depois, todo o DNA do fago D29 foi analisado com o objetivo de se localizar outros sítios para *Spe I* e o fragmento *hsp70-gfp* também foi avaliado. Muitas reações de digestão enzimática foram realizadas utilizando *Spe I*, concentrações de enzima e tempo de digestão variadas para se padronizar as condições ideais. Os fragmentos de 38.320 pb e o de 9.971 pb sempre estiveram presentes após digestão com *Spe I* e corrida eletroforética. Para se certificar do tamanho desses fragmentos, o marcador de tamanho molecular

“Lambda DNA – Mono cut mix” da New England BioLabs (48.502 / 38.416 / 33.498 / 29.946 / 24.508 / 23.994 / 17.053 / 15.004 / 10.086 / 1.503 pb) foi adquirido. Entretanto o Lambda DNA não se separava em eletroforese em agarose submersa. Para se ter certeza do tamanho dos fragmentos de DNA do fago D29 após digestão com *Spe I*, a eletroforese em campo pulsado foi padronizada utilizando o aparelho Bio-Rad Chef-DR® III disponível no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. As condições descritas para separação de fago lambda em eletroforese em campo pulsado foram adotadas e uma série de reações foi realizada, alterando-se o tempo de corrida. Dessa maneira foi possível confirmar que os fragmentos de DNA presentes no gel de agarose após digestão com *Spe I* e separação em eletroforese em campo pulsado eram aproximadamente de 38.320 pb e de 9.971 pb (**Figs. 17 e 18**). Na foto do perfil eletroforético do Lambda DNA – Mono cut mix” da New England BioLabs a banda de 1.503 pb aparece fraca e difusa e o tempo de corrida foi de 20 horas, por isso foi necessário otimizar a reação para evitar que a banda correspondente ao fragmento de 845 pb não fosse perdida durante o processo da corrida eletroforética. Todos os fragmentos produzidos nas reações de digestão (eletroforese EPS 1001 e campo pulsado) foram cortados do gel e purificados, conforme quadro dos resultados de D.O. (**Quadro 10**).

O plasmídeo pYL GFP foi desenvolvido e utilizado em pesquisas com câncer de bexiga. Esse plasmídeo foi introduzido por eletroporação em *M.bovis* BCG e o deslocamento da micobactéria em direção ao tumor foi indicado pela expressão da proteína verde fluorescente (LUO *et al.*, 1996). O fragmento correspondente a *hsp70-gfp* foi produzido pela PCR com sítios para *Spe I* nas suas extremidades e o pYL GFP foi usado como DNA molde e amplificado pela PCR com 35 ciclos,

possibilitando desse modo, volume e concentrações adequadas para a etapa de ligação com os fragmentos do fago D29. Diversas reações de ligação foram realizadas empregando a T4 DNA ligase. Os produtos de ligação foram incubados ao extrato fornecido pela Packagene® e Gigapack®, empregados para fornecer proteínas essenciais na montagem do envelope do fago D29. O produto de encapsulamento foi expandido em *M.smegmatis* m^c155. Após o período de incubação e expansão, a solução foi colocada sob luz UV e apresentou-se fluorescente (**Fig. 23**) e as amostras de isolados clínicos foram reativadas e testadas em testes de sensibilidade utilizando o método em microplacas com D29::*gfp*.

O método das proporções foi utilizado como padrão-ouro para avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos REMA e microplaca empregando o D29::*gfp*.

Na tentativa de melhorar a recuperação do fago lítico, recentemente foi adquirido o kit comercial da Gigapack (Stratagene, USA) de outra procedência, pois discussão via eletrônica com os pesquisadores da Universidade de Pisttsburg e sucessivas reações de encapsulamento foram conduzidas com o objetivo de se identificar um clone que expressasse a proteína verde fluorescente e promovesse a lise micobacteriana. Sucessivas expansões foram realizadas para aumentar a concentração do D29::*gfp* e o volume para os testes da CIM empregando o D29::*gfp* como agente revelador. Números significativos de placas foram montadas e as amostras de isolados clínicos foram avaliadas através da incorporação do fago D29::*gfp*. O padrão de fluorescência indicou a produção de proteína verde fluorescente (**Figs 23 e 24**), contudo não houve reprodutibilidade e correlação nos

resultados de sensibilidade quando comparados com o método das proporções e REMA, não justificando desse modo, a sua utilização como marcador de resistência aos fármacos na CIM em microplacas (**Fig. 24**). Os trabalhos realizados com transfecção de plasmídeos contendo o gene da proteína verde fluorescente têm sido avaliados por alguns autores e têm tido resultados interessantes (COLLINS *et al.*, 1998; TROLLIP *et al.*, 2001; ALBERT *et al.*, 2002 e CHANGSEN *et al.*, 2003). Na presente pesquisa não obtivemos um sucesso na otimização do sistema com fago lítico carreando o gene da proteína verde. Sem dúvidas mais estudos estão sendo realizados para averiguar o motivo da não reprodutibilidade e do baixo rendimento de fagos recombinantes e a diminuição maciça da atividade lítica do fago. No entanto, a expressão da proteína verde fluorescente foi obtida em todos os experimentos, com boa intensidade, mas o aumento não foi proporcional ao crescimento bacteriano, ou seja, não se deu resultados esperados. Acreditamos que a clonagem foi obtida, no entanto a infecção não está sendo proporcional devido a problema no envelope do fago. Supomos que a proteína do envelope do fago, devido às condições de transporte e armazenamento no processo de importação, sofreu algum dano que a atividade biológica tenha sido prejudicada. Estamos obtendo um outro kit de encapsulamento do DNA do fago recombinante para novamente avaliar a reação e procuraremos incorporar um promotor mais potente para melhorar a produção da proteína verde e assim avaliar as duas dúvidas que temos.

Concluindo o sistema proposto não foi adequado para a proposição realizada e novos estudos serão realizados utilizando promotores mais potentes como os descritos por CHANGSEN *et al.*, 2003 que gentilmente já nos cedeu amostras do seu plasmídeo para darmos seqüências ao estudo proposto.

CONCLUSÕES

Conclusões

- Foi possível construir o fago recombinante D29::*gfp* empregando a recombinação do DNA do fago D29 com o fragmento *hsp70-gfp* e posterior expressão da proteína verde fluorescente após transfecção em micobactérias.
- Os resultados de sensibilidade do REMA para isoniazida, rifampicina, etambutol e estreptomicina foram de 92%, 95%, 96% e 83% respectivamente, quando comparado ao método das proporções (padrão-ouro).
- Os perfis epidemiológicos identificados através de análise do MIRU agruparam os isolados em dois grupos, um com cerca de 40% de similaridade e quinze perfis diferentes e um outro grupo com 30% de similaridade com 24 perfis diferentes.
- Foram identificados 88 isolados clínicos utilizando a PCR IS6110 como *M.tuberculosis* e através do PRA *hsp65* foram identificadas 12 espécies micobacterianas não tuberculose.
- Não houve reprodutibilidade e correlação nos resultados de sensibilidade quando comparados o método REMA e do fago D29::*gfp*, não justificando desse modo a sua utilização como revelador no teste para determinação da CIM para H, R, S e E.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas ¹

ALBAY, A.; KISA, O.; BAYLAN, O.; DOGANCI, L. The evaluation of *FASTPlaque TB™* test for the rapid diagnosis of tuberculosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.46, n.3, p.211-215, 2003.

ALBERT, H.; HEYDENRYCH, A.; BROOKES, R.; MOLE, R.J.; HARLEY, B.; SUBOTSKY, E.; HENRY, R.; AZEVEDO, V. Performance of a rapid phage-based test, *FASTPlaque TB™*, to diagnose pulmonary tuberculosis from sputum specimens in South Africa. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.6, n.6, p.529-537, 2002.

ANGUS, B.J.; YATES, M.; CONTON, C.; BYREN, I. Cutaneous tuberculosis of the penis and sexual transmission of tuberculosis confirmed by molecular typing. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p.32-34, 2001.

ARAIN, T.M.; RESCONI, A.E.; HICKEY, M.J.; STOVER, C.K. Bioluminescence screening *in vitro* (Bio-Siv) assays for high-volume antimycobacterial drug discovery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, p.1536-1541, 1996.

ARANAZ, A.; LIEBANA, E.; GOMEZ-MAMPASSO, E.; GALAN, J.C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLÁZQUEZ, J.; BAQUERO, J.; MATEOS, A.; SUAREZ, G.; DOMÍNGUEZ, L. *M tuberculosis* subsp. *caprae* subs. nov: a taxonomia study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1263-1273, 1999.

1 – De acordo com a norma NBR 6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT).

BALISH, M.F.; SANTURRI, R.T.; RICCI, A.M.; LEE, K.K.; KRAUSE, D.C. Localization of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-associated protein HMW2 by fusion with green fluorescent protein: implications for attachment organelle structure. **Molecular Microbiology**, v.47, n.1, p.49-60, 2003.

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

BARCO P. **Caracterização molecular de mutações no gene *pncA* de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de origem brasileira**. São Paulo, 2004, p.147. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BARCO, P.; CARDOSO, R.F.; HIRATA, R.D.C.; LEITE, C.Q.F.; PANDOLFI, J.R.; SATO, D.N.; SHIKAMA, M.L.; FIUZA DE MELO, F.; MAMIZUKA, E.M.; CAMPANERUT, P.A.Z.; HIRATA, M.H. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, n.5, p.930-935, 2006.

BARDAROV, S.; KRIAKOV, J.; CARRIERE, C.; YU, S.; VAAMONDE, C.; McADAM, R.A.; BLOOM, B.R.; HATFULL, G.F.; JACOBS, W.R. Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.10961-10966, 1997.

BI, L.J.; ZHOU, Y.F.; ZHANG, X.E.; DENG, J.Y.; WEN, J.K.; ZHANG, Z.P. Construction and characterization of different MutS fusion proteins as recognition elements of DNA chip for detection of DNA mutations. **Biosensors & bioelectronics**, v.21, n.1, p.135-144, 2005.

BLOKPOEL, M.C.; O'TOOLE, R.; SMEULDERS, M.J.; WILLIAMS, H.D. Development and application of unstable GFP variants to kinetic studies of mycobacterial gene expression. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, n.2, p.203-211, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Endêmicas. Área Técnica de Pneumologia Sanitária. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose**. Rio de Janeiro, 2004. p.3.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5.ed. Rio de Janeiro: FUNASA, CRPHF, SBPT, 2005. 236p.

BROXMEYER, L. Bacteriophages: antibacterials with a future? **Medical hypotheses**, v.62, p.889-893, 2004.

BROWN, K.L.; SARKIS, G.J.; WADSWORTH, C.; HATFULL, G.F. Transcriptional silencing by the mycobacteriophage L5 repressor. **The EMBO Journal**, v.16, p.5914-5921, 1997.

BURLAGE, R.S.; YANG, Z.K.; MEHLHORN, T. A transposon for green fluorescent protein transcriptional fusions: application for bacterial transport experiments. **Gene**, v.173, p.53-58, 1996.

BUTT, T.; AHMAD, R.N.; KAZMI, S.Y.; MAHMOOD, A. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by mycobacteriophage assay. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.8, n.7, p.899-902, 2004.

CABANTOUS, S.; PEDELACQ, J.D.; MARK, B.L.; NARANIO, C.; TERWILLIGER, T.C.; WALDO, G.S. Recent advances in GFP folding reporter and split-GFP solubility reporter technologies. Application to improving the folding and solubility of recalcitrant proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Structural and Functional Genomics**, v.6, n.2/3, p.113-119, 2005.

CAMPOS, M.M.A. **Emprego do bacteriófago D29 na determinação quantitativa da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina e sua correlação com o gene *rhoB***. São Paulo, 2001, p.91. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CANETTI, G.; RIST, N.; GROSSET, J. **Mésure de la sensibilité du bacilli tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. *Revue de Tuberculose et de Pneumologie*, v.27, p.217, 1963.**

CARDOSO, R.F. **Análise de mutações nos genes relacionados com resistência a isoniazida (INH) em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de origem brasileira**. São Paulo, 2003, p.135. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Área de Análises Clínicas – Universidade de São Paulo.

CARDOSO, R.F.; COOKSEY, R.C.; MORLOCK, G.P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C.Q.F.; SATO, D.N.; SHIKAMA, M.L.; MAMIZUKA, E.M.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H. **Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, p.3373-3381, 2004.**

CARRIÈRE, C.; RISKA, P.F.; ZIMHONY, O.; KRIAKOV, J.; BARDAROV, S.; BURNS, J.; CHAN, J.; JACOBS, W.R. **Conditionally replicating luciferase reporter phages: improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p.3232-3239, 1997.**

CASPER, S.; HOLT, C. **Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector. *Gene*, v.173, p.69-73, 1996.**

CASTRO-GARZA, J.; KING, C.H.; SWORDS, W.E.; QUINN, F.D. **Demonstration of spread by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in A549 epithelial cell monolayers. *FEMS Microbiology Letters*, v.212, n.2, p.145-149, 2002.**

CAVIEDES, L.; DELGADO, J.; GILMAN, R.H. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.5, p.1873-1874, 2002.

CAWS, M.; DROBNIEWSKI, F.A. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.953, p.138-145, 2001.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.; PRASHER, D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v.263, p.802-805, 1994.

CHANGSEN, C.; FRANZBLAU, S.G.; PALITTAPONGAMPIM, P. Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.12, p.3.682-3.687, 2003.

CHAUCA, J.A.; PALOMINO, J.C.; GUERRA, H. Evaluation of rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage D29-based assay. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.360-364, 2007.

CHRISTENSEN, B.B.; STERNBERG, C.; MOLIN, S. Bacterial plasmid conjugation on semi-solid surfaces monitored with the green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea victoria* as a marker. **Gene**, v.173, p.59-65, 1996.

COCKERILL, F.R.; UHL, J.R.; TEMESGEN, Z.; ZHANG, Y.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G.D.; WILLIAMS, D.L.; KLINE, B.C. Rapid identification of a point mutation of the *M. tuberculosis* catalase-peroxidase (*KatG*) gene associated with isoniazid resistance. **The Journal of Infectious Diseases**, v.171, p.240-245, 1995.

CODY, C.W.; PRASHER, D.C.; WESTLER, W.M.; PRENDERGAST, F.G.; WARD, W.W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. **Biochemistry**, v.32, p.1212-1218, 1993.

COHEN, T.; SOMMERS, B.; MURRAY, M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3. p.13-21, 2003.

COKER, R.J. Multidrug-resistant tuberculosis: public health challenges. **Tropical Medicine & International Health**, v.9, n.1, p.25-40, 2004.

COLE, S.T. *Mycobacterium tuberculosis*: tuberculosis drug-resistance mechanisms. **Trends in Microbiology**, v.2, n.10, p.411-415, 1994.

COLLIS, L.A.; FRANZBLAU, S.G. Microplate-alar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, n.5, p.1004-1009, 1997.

COLLINS, L.A.; TORRERO, M.N.; FRANZBLAU, S.G. Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.2, p.344-347, 1998.

COLSTON, M.J.; COX, R.A. Mycobacterial growth and dormancy. In: RATLEDGE, C.; DALE, J., eds. **Mycobacteria**: molecular biology and virulence. Oxford: Blackwell Science, 1999. p.198-219.

CORBETT, E.L.; WATT, C.J.; WALKER, N.; MAHER, D.; WILLIAMS, B.G.; RAVIGLIONE, M.C.; DYE, C. The growing burden of tuberculosis: global trends interactions with the HIV epidemic. **Archives of Internal Medicine**, v.163, n.9, p.1009-1021, 2003.

COUSINS, D.V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; TUOHY, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D.M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D.; RODRÍGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M.I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipeddi* sp. nov.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.53, p.1305-1314, 2003.

CRAMERI, A.; WHITEHORN, E.A.; TATE, E.; STEMMER, W.P.C. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. **Nature Biotechnology**, v.14, p.315-319, 1996.

CRISPEN, R.G. Biological and ultrastructural characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* cells and cell components, 1967. Ph. D. Thesis - Northwestern University Medical School.

DANELISHVILI, L.; WU, M.; YOUNG, L.S.; BERMUDEZ, L.E. Genomic approach to identifying the putative target of the mechanisms of resistance to mefloquine in mycobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.9, p.3707-3014, 2005.

DAVIES, P.D.O. **Multi-drug resistant tuberculosis**. TB Focus, 1999. Disponível em: <http://www.priory.com/cmolt/TBMultid.htm>. Acesso em: 15 ago. 2006.

DHANDAYUTHAPANI, S.; VIA, L.E.; THOMAS, C.A.; HOROWITZ, P.M.; DERETIC, D.; DERETIC, V. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and cell biology of mycobacterial interactions with macrophages. **Molecular Microbiology**, v.17, n.5, p.901-912, 1995.

DHANDAYUTHAPANI, S.; ZHANG, Y.; MUDD, M.H.; DERETIC, V. Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in mycobacteria: characterization and inducibility of *ahpC* peroxidases in *Mycobacterium smegmatis* and lack of expression in *M. aurum* and *M. tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.3641-3649, 1996.

ELTRINGHAM, I.J.; DROBNIIEWSKI, F.A.; MANGAN, J.A.; BUTCHER, P.D.; WILSON, S.M. Evaluation of reverse transcription-PCR and a bacteriophage-based assay for rapid phenotypic detection of rifampin resistance in clinical isolates of

Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.11, p.3524-3527, 1999a.

ELTRINGHAM, I.J.; WILSON, S.M.; DROBNIIEWSKI, F.A. Evaluation of a bacteriophage-based assay (phage amplified biologically assay) as a rapid screen for resistance to isoniazid, ethambutol, streptomycin, pyrazinamide, and ciprofloxacin among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.3528-3532, 1999b.

EPEL, B.; PADGETT, H.; HEINLEIN, M.; BEACHY, R. Plant virus movement protein dynamics probed with a GFP-protein fusion. **Gene**, v.173, p.75-79, 1996.

FERRAZOLI, L.; PALACI, M.; TELLES, M.A.S.; UEKI, S, Y.; KRITSKI, A.; MARQUES, L.R.M.; FERREIRA, O.C.; RILEY, L.W. Catalase expression, *KatG*, and MIC of isoniazid for *Mycobacterium tuberculosis* isolates from São Paulo, Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v.171, p.237-240, 1995.

FINKEN, M.; KIRSCHNER, P.; MEIER, A.; WREDE, A.; BOTTGER, E.C. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. **Molecular Microbiology**, v.9, p.1239-1246, 1993.

FISCHL, M.A.; DAIKOS, G.L. Clinical presentation and outcome of patients with HIV infection and tuberculosis caused by multiple-drug resistance bacilli. **Annals of Internal Medicine**, v.177, p.184-190, 1992.

FIUZA DE MELO, F.A.; AFIUNE, J.B. Transmissão e imunopatologia da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.19, n.1, p.19-24, 1993.

FIUZA DE MELO, F.A.; AFIUNE, J.B.; ALMEIDA, E.A.; SPADA, D.T.A.; CASTELO FILHO, A. A resistência primária do *Mycobacterium tuberculosis* em uma unidade de referência na cidade de São Paulo: evolução por quatro décadas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.26, supl.2, p.S130, 2000.

FIÚZA DE MELO, F.A.; AFIUNE, J.B.; IDE NETO, J.; ALMEIDA, E.A.; SPADA, D.T.A.; ANTELMO, A.N.L.; CRUZ, M.L. Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.27-34, 2003.

FORD, M.E.; SARKIS, G.J.; BELANGER, A.E.; HENDRIX, R.W.; HATFULL, G.F. Genome structure of mycobacteriophage D29: Implications for phage evolution. **Journal of Molecular Biology**, v.279, p.143-164, 1998.

FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; McLAUGHLIN, J.C.; TORRES, P.; FUENTES, P.; COOK, M.B.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M.T.; QUENZER, V.K.; FEERGUSON, R.M.; SHEEN, P.; GILMAN, R.H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* by the microplate alamar blue assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.2, p.362-366, 1998.

GALÍ, N.; DOMÍNGUEZ, J.; BLANCO, S.; PRAT, C.; ALCAIDE, F.; COLL, P.; AUSINA, V. Use of a mycobacteriophage-based assay for rapid assessment of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to isoniazid and influence of resistance level on assay performance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.1, p.201-205, 2006.

GANGOPADHYAY, J.P.; JIANG, S.Q.; PAULUS, H. An *in vitro* screening system for protein splicing inhibitors based on green fluorescent protein as an indicator. **Analytical Chemistry**, v.75, n.10, p.2456-2462, 2003.

GARDNER, G.M.; WEISER, R.S.A. A bacteriophage for *Mycobacterium smegmatis*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.66, p.205-206, 1947.

GOMATHI, N.S.; SAMEER, H.; KUMAR, V.; BALAJI, S.; DUSTACKEER, V.N.; NARAYANAN, P.R. *In silico* analysis of mycobacteriophage Che12 genome: Characterization of genes required to lysogenise *Mycobacterium tuberculosis*. **Computational Biology and Chemistry**, v.31, n.2, p.82-91, 2007.

GONG, J.H.; ZHANG, M.; MODLIN, R.L.; LINSLEY, P.S.; IYER, D.; LIN, Y.; BARNES, P.F. Interleukin-10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. **Infection and Immunity**, v.64, n.3, p.913-918, 1996.

HATFULL, G.F.; JACOBS, W.R. Mycobacteriophages: cornerstones of mycobacterial research. In: BLOOM, B.R., ed. **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control**. Washington: American Society for Microbiology Press, 1994. p.165-183.

HEIFETS, L.; LINDHOLM-LEVY, P. Pyrazinamide sterilizing activity *in vitro* against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. **The American Review of Respiratory Disease**, v.145, p.1223-1225, 1992.

HEYM, B.; ZHANG, Y.; POULET, S.; YOUNG, D.; COLE, S.T. Characterization of the *KatG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.4255-4259, 1993.

HIRANO, K.; TAKAHASHI, M.; KAZUMI, Y.; FUKASAWA, Y.; ABE, C. Mutation in *pncA* is a major mechanisms of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.78, p.117-122, 1997.

HONORE, N.; COLE, S.T. Streptomycin resistance in mycobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, p.238-242, 1994.

INOUE, S.; TSUJI, F.I. Evidence for redox forms of the Aequorea green fluorescent protein. **FEBS Letters**, v.351, p.211-214, 1994.

JACOBS, W.R.; BARLETTA, R.G.; UDANI, R.; CHAN, J.; KALKUT, G.; SOSNE, G.; KIESER, T.; SARKIS, G.J.; HATFULL, G.F.; BLOOM, B.R. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. **Sciences**, v.260, p.819-822, 1993.

JENSEN-CAIN, D.M.; QUINN, F.D. Differential expression of sig E by *Mycobacterium tuberculosis* during intracellular growth. **Microbial Pathogenesis**, v.30, n.5, p.271-278, 2001.

JONES, W.D.; DAVID, H.L. Inhibition by rifampin of mycobacteriophage D29 replication in its drug-resistant host *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607. **The American Review of Respiratory Disease**, v.103, n.5, p.618-624, 1971.

JONES, D.; PELL, P.A.; SNEATH, P.H.A. Maintenance of bacteria on glass beads at -60°C to -70°C . In: KIRSOP, B.E.; DOYLE, A., eds. **Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods**. 2.ed. London: Academic Press, 1991. 308p.

KAHANA, J., SCHAPP, B., SILVER, P. Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.9707-9711, 1995.

KALANTRI, S.; PAI, M.; PASCOPELLA, L.; RILEY, L.; REINGOLD, A. Bacteriophage-based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v.5, n.59, p.1-15, 2005.

KOLATTUKUDY, P.E.; FERNANDES, N.D.; AZAD, A.K.; FITZMAURICE, A.M.; SIRAKOVA, A.T. Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. **Molecular Microbiology**, v.24, p.263-270, 1997.

KREMER, L.; BAULARD, A.; ESTAQUIER, J.; POULAIN-GODEFROY, O.; LOCHT, C. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. **Molecular Microbiology**, v.17, n.5, p.913-922, 1995.

LEITE, C.Q.F.; BERETTA, A.L.R.Z.; ANNO, I.S.; TELLES, M.A.S. Standartization of broth microdilution method for *Mycobacterium tuberculosis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.1, p.127-129, 2000.

LUDIN, B.; DOLL, T.; MEILL, R.; KAECH, S.; MATUS, A. Application of novel vectors for GFP-tagging of proteins to study microtubule-associated proteins. **Gene**, v.173, p.107-111, 1996.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo

LUO, Y.; CHEN, X.; SZILVASI, A.; O'DONNELL, M.A. Co-expression of interleukin-2 and green fluorescent protein reporter in mycobacteria: *in vivo* application for monitoring antimycobacterial immunity. **Molecular Immunology**, v.37, n.9, p.527-536, 2000.

LUO, Y.; SZILVAKI, A.; CHEN, X.; DEWOLF, W.; O'DONNELL, M. A novel method for monitoring *Mycobacterium bovis* BCG trafficking with recombinant BCG expressing green fluorescent protein. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.3, n.6, p.761-767, 1996.

MAREI, A.M.; EL-BEHEDY, E.M.; MOHTADY, H.A.; AFIFY, A.F. Evaluation of a rapid bacteriophage-based method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.331-335, 2003.

MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.11, p.3616-3619, 2003.

MARTIN, A.; TAKIFF, H.; VANDAMME, P.; SWINGS, J.; PALOMINO, J.C.; PORTAELS, F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, n.2, p.327-331, 2006.

MASTER, S.; ZAHRT, T.C.; SONG, J.; DERETIC, V. Mapping of *Mycobacterium tuberculosis* *KatG* promoters and their differential expression in infected macrophages. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.13, p.4033-4039, 2001.

MBULO, G.M.K.; KAMBASHI, B.S.; KINKESE, J.; TEMBWE, R.; SHUMBA, B.; GODFREY-FAUSSETT, P.; McNERNEY, R. Comparison of two bacteriophage tests

and nucleic acid amplification for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in sub-Saharan Africa. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.8, n.11, p.1342-1347, 2004.

McNERNEY, R.; KAMBASHI, B.S.; KINKESE, J.; TEMBWE, R.; GODFREY-FAUSSETT, P. Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.5, p.2115-2120, 2004.

MILLER, L.P.; CRAWFORD, J.T.; SHINNICK, T.M. The *rpo β* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, p.805-811, 1994.

MITCHISON, D.A. Basic mechanisms of chemotherapy. **Chest**, v.76, p.771-781, 1979.

MIYAGI, C.; YAMANE, N.; YOGESH, B.; ANO, H.; TAKASHIMA, T. Genetic and phenotypic characterization of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Japan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.48, p.111-116, 2004.

MORRIS, S.; BAI, G.H.; SUFFYS, P.; PORTILHO-GOMES, J.; FAIRCHOK, M.; ROUSE, D. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.171, p.954-960, 1995.

MUSSER, J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p.496-514, 1995.

MUSSER, J.M.; KAPUR, V.; WILLIAMS, D.L.; KREISWIRTH, B.N.; VAN SOOLINGEN, D.; VAN EMBDEN, J.D.A. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*KatG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing restricted array of mutations associated with drug resistance. **The Journal of Infectious Diseases**, v.173, p.196-202, 1996.

MUZAFFAR, R.; BATOOL, S.; AZIZ, F.; NAQVI, A.; RIZVI, A. Evaluation of the *FASTPlaque TB™* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.6, n.7, p.635-640, 2002.

NAIR, J.; ROUSE, D.A.; BAI, G.H.; MORRIS, S.L. The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v.10, p.521-527, 1993.

NATECHE, F.; MARTIN, A.; BARAKA, S.; PALOMINO, J.C.; KHALED, S.; PORTAELS, F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.857-860, 2006.

O'TOOLE, R.; SMEULDERS, M.J.; BLOKPOEL, M.C.; KAY, E.J.; LOUGHEED, K.; WILLIAMS, H.D. A two-component regulator of universal stress protein expression and adaptation to oxygen starvation in *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.5, p.1543-1554, 2003.

PALOMINO, J.C. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.12, n.3, p.172-178, 2006.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.8, p.2720-2722, 2002.

PARK, D.J.; DROBNIEWSKI, F.A.; MEYER, A.; WILSON, S.M. Use of a phage-based assay for phenotypic detection of mycobacteria directly from sputum. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.680-688, 2003.

PEARSON, R.E.; JURGENSEN, S.; SARKIS, G.J.; HATFULL, G.F.; JACOBS, W.R. Construction of D29 shuttle plasmids and luciferase reporter phages for detection of mycobacteria. **Gene**, v.183, p.129-136, 1996.

PENA, C.E.A.; STONER, J.; HATFULL, G.F. Mycobacteriophage D29 integrase mediated recombination: specificity of mycobacteriophage integration. **Gene**, v.225, p.143-151, 1998.

PFYFFER, G.E.; AUCKENTHALER, R.; EMBDEN, J.D.A.; SOOLINGEN, D. *Mycobacterium canneti*, the smooth variant of *M.tuberculosis*, isolated from a swiss patient exposed in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, n.4, p.631-634, 1998.

PRASHER, D.; ECKENRODE, V.; WARD, W.; PRENDERGAST, F.; CORMIER, M. Primary structure of the *Aequorea Victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, v.111, p.229-233, 1992.

RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, n.2, p.195-209, 1998.

RAVIGLIONE, M.C.; SNIDER, J.D.E.; KOCHI, A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **JAMA : the Journal of the American Medical Association**, v.273, p.220-226, 1995.

RISKA, P.F.; JACOBS, W.R.; BLOOM, B.R.; MCKITRICK, J.; CHAN, J. Specific identification of *Mycobacterium tuberculosis* with the luciferase reporter mycobacteriophage: use of *p*-nitro-B-hydroxypropiophenone. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.3225-3231, 1997.

ROBART, F.D.; WARD, W.W. Solvent perturbations of *Aequorea* green fluorescent protein. **Photochemistry**, v.51, 92S, 1990.

ROBERTS, G.D.; GOODMAN, N.L.; HEIFETS, L.; LARSH, H.W.; LINDNER, T.H.; McCLATCHY, J.K.; MCGINNIS M.R.; SIDDIQI, S.H.; WRIGHT, P. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, n.3, p.689-696, 1983.

ROSEMBERG, J. **Tuberculose**: panorama global, óbices para o seu controle. Fortaleza: Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, 1999. 123p.

ROUSE, D.A.; LI, Z.; BAI, H.; MORRIS, S.L. Characterization of the *KatG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.2472-2477, 1995.

RYBNIKER, J.; KRAMME, S.; SMALL, P.L. Host range of 14 mycobacteriophage in *Mycobacterium ulcerans* and seven other mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis* – application for identification and susceptibility testing. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.37-42, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. v.1, p.2.85-4.54.

SAMPSON, S.L.; LUKEY, P.; WARREN, R.M.; VAN HELDEN, P.D.; RICHARDSON, M.; EVERETT, M.J. Expression, characterization and subcellular localization of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE gene Rv1917c. **Tubercle**, v.81, n.5/6, p.305-317, 2001.

SARKIS, G.; JACOBS, W.R.; HATFULL, G.F. L5 luciferase reporter mycobacteriophages: a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria. **Molecular Microbiology**, v.15, p.1055-1067, 1995.

SATO, D.N. **Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene da luciferase**. Araraquara, 2003. 120p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho.

SCARPARO, C.; RICORDI, P.; RUGGIERO, G.; PICCOLI, P. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460 TB method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3, p.1109-1114, 2004.

SHERMAN, D.R.; MDLULI, K.; HICKEY, M.J.; ARAIN, T.M.; MORRIS, S.L.; BARRY III, C.E.; STOVER, C.K. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v.272, p.1641-1643, 1996.

SHINNICK, T.M.; GOOD, R.C. Mycobacterial taxonomy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.13, n.11, p.884-901, 1994.

SILVA, P.A.; BOFFO, M.M.S.; MATTOS, I.G.; SILVA, A.B.S.; PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; TAKIFF, H.E. Comparison of redux and D29 phage methods for detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, p.293-296, 2006.

SNIDER, D.E.; RAVIGLIONE, M.; KOCHI, A. A global burden of tuberculosis. In: BLOOM, B.R., ed. **Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control**. Washington: American Society for Microbiology Press, 1994. p.3–11.

SOLA, C.; FILLIOL, I.; LEGRAND, E.; LESJEAN, S.; LOCHT, C.; SUPPLY, P.; RASTOGI, N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v.3, n.2, p.125-133, 2003.

SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; HAAS, P.E.W.; HERMANS, P.W.M.; KOEDAM, M.A.; TEPPEMA, R.S.; BRENNAN, P.J.; BESRA, G.S.; PORTAELS, F.; TOP, J.; SCHOULS, L.M.; EMBDEN, J.D.A. A novel pathogenic taxon the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, n.4, p.1236-1245, 1997.

SRIVASTAVA, V.; ROUANET, C.; SRIVASTAVA, R.; RAMALINGAM, B.; LOCHT, C.; SVIRASTAVA, B.S. Macrophage-specific *Mycobacterium tuberculosis* genes: identification by green fluorescent protein and kanamycin resistance selection. **Microbiology**, v.153, p.659-666, 2007.

SULA, L.; SULOVA, J.; STOLCPARTOVA, M. Therapy of experimental tuberculosis in guinea pigs with mycobacterial phages DS-6A, GR-21T, My-327. **Czechoslovak Medicine**, v.4, p.209-214, 1981.

SUPPLY, P.; LESJEAN, S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; SOOLINGEN, D.; LOCHT, C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.10, p.3563-3571, 2001.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F. Detection of rifampin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Lancet**, v.341, p.647-650, 1993a.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; SCHIMIDHEINI, T.; BODMER, T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, n.10, p.2054-2058, 1993b.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E.C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.2, p.175-178, 1993c.

THORNE, N.; UNDERWOOD, A.; GHARBIA, S.; ARNOLD, C. Evolutionary clues from comparative analysis of *Mycobacterium tuberculosis* variable-number tandem repeat sequences within genetic families. **Infection, Genetics and Evolution**, v.7, n.2, p.239-246, 2007.

TRAORE, H.; OGWANG, S.; MALLARD, K.; JOLOBA, M.L.; MUMBOWA, F.; NARAYAN, K.; KAYES, S.; JONES-LOPEZ, E.C.; SMITH, P.G.; ELLNER, J.J.; MUGERWA, R.D.; EISENACH, K.D.; McNERNEY, R. Low-cost rapid detection of rifampicin resistant tuberculosis using bacteriophage in Kampala, Uganda. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.9, p.6-1, 2007.

TROLLIP, A.; ALBERT, H.; MASKELL, T. Bacteriophage-based technologies for the rapid diagnosis and drug susceptibility testing of tuberculosis. **American Clinical Laboratory**, v.20, n.9, p.39-42, 2001.

TULLIUS, M.V.; HARTH, G.; HORWICTZ, M.A. High extracellular levels of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase and superoxide dismutase in actively growing cultures are due to high expression and extracellular stability rather than to a protein-specific export mechanism. **Infection and Immunity**, v.69, n.10, p.6348-6363, 2001.

VAN EMBDEN, J.D.A.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.T. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.406-409, 1993.

VAN RIE, A.; WARREN, R.; RICHARDSON, M.; GIE, R.P.; ENARSON, D.A.; BEYERS, N.; VAN HELDEN, P.D. Classification of drug-resistant tuberculosis in an epidemic area. **Lancet**, v.356, n.1, p.22-25, 2000.

WALLIS, R.S.; VJECHA, M.; AMIR-TAHMASSEB, M.; OKWERA, A.; BYEWASO, F.; NYOLE, S.; KANEMGERA, S.; MUGERWA, R.D.; ELLNER, J.J. Influence of tuberculosis on human immunodeficiency virus (HIV-1): enhanced cytokine expression and elevated beta 2-microglobulin in HIV-1-associated tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.167, p.43-48, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Sites. Tuberculosis (TB). TB Publications. 2007. WHO report 2007. **Global tuberculosis control - Surveillance, planning, financing**. Geneva, 2007. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acesso em: 15 maio 2007.

WILSON, S.M.; AL-SUWAIDI, Z.; McNERNEY, R.; PORTER, J.; DROBNIIEWSKI, F. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Medicine**, v.34, p.465-468, 1997.*YAMAZAKI, Y.; DANELISHVILI, L.; WU, M.; MACNAB, M.; BERMUDEZ, L.E.

Mycobacterium avium genes associated with the ability to form a biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.1, p.819-825, 2006.

YOUMANS, G.P. **Tuberculosis**. Washington: Saunders, 1979. 511p.

YUAN, Y.; MEAD, D.; SCHROEDER, B.G.; ZHU, Y.; BARRY, C.E. The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.33, p.21282-21290, 1998.

YZQUIERDO, S.L.; LEMUS, D.; ECHEMENDIA, M.; MONTORO, E.; McNERNEY, R.; MARTÍN, A.; PALOMINO, J.C. Evaluation of phage assay for rapid phenotypic detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.5, 2006. Disponível em: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/pdf/1476-0711-5-11.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2006.

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

ANEXOS

ANEXO 1

Quadro 5 - Resultados dos testes de sensibilidade a antirnicobacterianos pelos métodos das proporções e REMA de isolados clínicos de *M. tuberculosis* identificados pela PCR IS6110.

Nº isol. clínico	Nº do teste sensibilidade	Nº da cultura	Método proporções	REMA	Genotipagem PCR IS6110
1	H37Rv		H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M. tuberculosis</i>
2	Cepa controle resistente		H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r (0,25) S - r (1) E - r > ou = 16	<i>M. tuberculosis</i>
3	83/05	680	H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r (0,5) S - r > ou = 8 E - r > ou = 16	<i>M. tuberculosis</i>
4	89/05	741	H - s R - s S - r E - r	H - s R - s S - s E - r (4)	<i>M. tuberculosis</i>
5	137/05	1205	H - r R - r S - r E - r	H - r (0,125) R - r (0,015) S - r (2) E - r (8)	<i>M. tuberculosis</i>
6	137/06	4534	H - r R - r S - r E - r	H - r (0,25) R - r (0,5) S - r (2) E - r > ou = 16	<i>M. tuberculosis</i>
7	145/05	1456	H - r R - r S - s E - s	H - r (0,125) R - r (0,06) S - s E - s	<i>M. tuberculosis</i>

Nº isol. clínico	Nº do teste sensibilidade	Nº da cultura	Método proporções	REMA	Genotipagem PCR IS6110
8	152/05	1712	H - r R - s S - r E - s	H-r (0,125) R - s S - r (2) E-r>ou =16	<i>M.tuberculosis</i>
9	159/05	1770	H - r R - r S - r E - r	H- r >ou =1 R - r (0,06) S - r (2) E-r>ou =16	<i>M.tuberculosis</i>
10	171/05	1906	H - r R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
11	193/05	2145	H - r R - r S - r E - r	H - r (0,03) R - r (0,03) S - r (0,25) E - r (0,5)	<i>M.tuberculosis</i>
12	226/05	2476	H - r R - r S - s E - r	H- r >ou =1 R - r (0,03) S - s E-r>ou =16	<i>M.tuberculosis</i>
13	226/05	2476	H - r R - r S - s E - r	H- r >ou =1 R - r (0,5) S - s E - r (8)	<i>M.tuberculosis</i>
14	228/05	2508	H - r R - r S - s E - r	H - s R - r (0,06) S - s E - r (8)	<i>M.tuberculosis</i>
15	230/05	2397	H - r R - r S - r E - r	H - r (0,03) R- r (0,015) S- r (0,125) E - r (1)	<i>M.tuberculosis</i>
16	243/05	2643	H - s R - s S - r E - r	H-r >ou = 1 R - s S - r (1) E-r> ou =16	<i>M.tuberculosis</i>
17	247/05	2700	H - r R - r S - r E - s	H- r >ou =1 R- r (0,125) S - r (2) E - s	<i>M.tuberculosis</i>

Nº isol. clínico	Nº do teste sensibilidade	Nº da cultura	Método proporções	REMA	Genotipagem PCR IS6110
18	250/05	2763	H - s R - s S - s E - s	H- r >ou =1 R- r (0,125) S - r (2) E-r> =16	<i>M.tuberculosis</i>
19	251/05	2769	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
20	252/05	2775	H - r R - r S - s E - r	H- r >ou =1 R - s S - s E-r>ou =16	<i>M.tuberculosis</i>
21	252/05	3807	H - r R - r S - s E - r	H- r >ou =1 R - r (0,5) S - s E - r (8)	<i>M.tuberculosis</i>
22	253/05	2791	H - r R - s S - s E - s	H - r>ou =1 R - s S - r (1) E - s	<i>M.tuberculosis</i>
23	264/05	2906	H - r R - r S - s E - s	H- r >ou =1 R- r (0,125) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
24	264/05	2906	H - r R - r S - s E - s	H- r >ou =1 R - r (0,5) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
25	267/05	2951	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
26	270/05	3022	H - r R - r S - s E - s	H- r >ou =1 R- r >ou =1 S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
27	273/05	3117	H - r R - r S - s E - s	H - r (0,06) R - r (0,5) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>

Nº isol. clínico	Nº do teste sensibilidade	Nº da cultura	Método proporções	REMA	Genotipagem PCR IS6110
28	274/05	3103	H - r R - s S - r E - s	H - r >ou =1 R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
29	281/05	3231	H - r R - s S - r E - r	H - r (0,06) R - s S - r (4) E - r (2)	<i>M.tuberculosis</i>
30	283/05	3250	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
31	285/05	3309	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
32	287/05	3314	H - r R - r S - r E - r	H - r >ou =1 R - r (0,06) S - r (0,5) E - r >ou =16	<i>M.tuberculosis</i>
33	297/05	3470	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
34	299/05	3509	H - r R - r S - s E - s	H - r >ou =1 R - r (0,03) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
35	300/05	3511	H - r R - s S - r E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
36	312/05	3703	H - r R - r S - r E - r	H - r >ou =1 R - s S - r (0,25) E - r >ou =16	<i>M.tuberculosis</i>
37	314/05	3533	H - r R - r S - s E - s	H - r (0,25) R - r (0,5) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>

Nº isol. clínico	Nº do teste sensibilidade	Nº da cultura	Método proporções	REMA	Genotipagem PCR IS6110
38	317/05	3759	H - r R - r S - r E - r	H - r >ou =1 R - r (0,03) S - r (0,25) E - r >ou =16	<i>M.tuberculosis</i>
39	320/05	2600	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
40	320/06	3805	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
41	322/05	3851	H - r R - r S - s E - s	H - r >ou =1 R - r (0,03) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
42	329/05	3907	H - r R - r S - r E - r	H - r >ou =1 R - r (0,25) S - r (0,125) E - r (4)	<i>M.tuberculosis</i>
43	331/06	3968	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
44	336/05	3969	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
45	345/05	4462	H - s R - s S - r E - r	H - s R - s S - r (2) E - r (4)	<i>M.tuberculosis</i>
46	347/06	4481	H - r R - r S - s E - r	H - r (0,06) R - r (0,5) S - r (0,5) E - r >ou =16	<i>M.tuberculosis</i>
47	349/05	4515	H - r R - r S - s E - s	H - r (0,5) R - r (0,25) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>

Nº isol. clínico	Nº do teste sensibilidade	Nº da cultura	Método proporções	REMA	Genotipagem PCR IS6110
48	352/05	4558	H - r R - r S - r E - r	H- r >ou =1 R- r (0,125) S - r >ou =8 E - r (1)	<i>M.tuberculosis</i>
49	355/05	4520	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
50	361/05	4650	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
51	362/05	4655	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
52	363/05	4660	H - s R - s S - r E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
53	365/05	5393	H - s R - s S - r E - s	H-r >ou =1 R - s S - r (2) E - s	<i>M.tuberculosis</i>
54	367/06	4679	H - r R - r S - s E - s	H- r >ou =1 R - r (0,5) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
55	369/06	4703	H - r R - r S - r E - r	H- r >ou =1 R - r (0,5) S - r (2) E - r (8)	<i>M.tuberculosis</i>
56	370/05	2059	H - r R - r S - s E - r	H- r >ou =1 R - r (0,06) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
57	370/06	5023	H - r R - r S - s E - s	H - r (0,03) R - r (0,5) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>

Nº isol. clínico	Nº do teste sensibilidade	Nº da cultura	Método proporções	REMA	Genotipagem PCR IS6110
58	371/05	4738	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
59	372/06	4753	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
60	373/06	4754	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
61	374/06	4766	H - r R - r S - r E - s	H - r (0,25) R r (0,125) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
62	375/06	4777	H - s R - s S - r E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
63	377/06	4914	H - r R - r S - r E - r	H- r > ou =1 R - r (0,25) S - r (2) E - r (8)	<i>M.tuberculosis</i>
64	380/06	4694	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
65	394/06	4436	H - r R - r S - r E - r	H-r > ou =1 R-r > ou =1 S-r > ou = 8 E-r > ou = 16	<i>M.tuberculosis</i>
66	01/06	460	H - s R - r S - s E - r	H - s R-r > ou =1 S - s E - r (8)	<i>M.tuberculosis</i>
67	02/06	356	H - s R - s S - r E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>

Nº isol. clínico	Nº do teste sensibilidade	Nº da cultura	Método proporções	REMA	Genotipagem PCR IS6110
68	04/06	551	H - r R - r S - s E - r	H - r > ou = 1 R - r (0,5) S - s E - r > ou = 16	<i>M.tuberculosis</i>
69	05/06	401	H - r R - r S - s E - s	H - r > ou = 1 R - r > ou = 1 S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
70	10/06	472	H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r > ou = 1 S - r (2) E - r > ou = 16	<i>M.tuberculosis</i>
71	13/06	5225	H - r R - r S - r E - s	H - r > ou = 1 R - s S - r > ou = 8 E - s	<i>M.tuberculosis</i>
72	14/06	5277	H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r > ou = 1 S - r (2) E - r > ou = 16	<i>M.tuberculosis</i>
73	15/06	5232	H - r R - r S - s E - s	H - r (0,25) R - r (0,5) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
74	16/06	5253	H - s R - s S - r E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
75	17/06	38554	H - r R - r S - s E - s	H - r > ou = 1 R - r (0,5) S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
76	22/06	5136	H - r R - r S - s E - s	H - r > ou = 1 R - r > ou = 1 S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
77	23/06	5230	H - s R - s S - s E - s	H - r > ou = 1 R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>

Nº isol. clínico	Nº do teste sensibilidade	Nº da cultura	Método proporções	REMA	Genotipagem PCR IS6110
78	24/06	5239	H - r R - r S - s E - r	H - r (0,25) R - r (0,5) S - s E-r>ou =16	<i>M.tuberculosis</i>
79	25/06	5244	H - r R - r S - r E - s	H - r (0,5) R - r (0,25) S - r (4) E - s	<i>M.tuberculosis</i>
80	27/06	5254	H - r R - r S - r E - r	H-r (0,125) R-r >ou = 1 S - r (4) E - r (2)	<i>M.tuberculosis</i>
81	29/06	5369	H - r R - s S - r E - s	H- r >ou =1 R - s S - r (0,25) E - s	<i>M.tuberculosis</i>
82	31/06	5400	H - r R - r S - r E - r	H- r >ou =1 R- r >ou =1 S - s E-r>ou =16	<i>M.tuberculosis</i>
83	38/06	111	H - r R - r S - r E - s	H- r > ou=1 R-r > ou =1 S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
84	40/06	137	H - s R - s S - r E - s	H - s R - s S - r (2) E - s	<i>M.tuberculosis</i>
85	42/06	141	H - r R - r S - r E - s	H-r > ou =1 R - r (0,5) S - r (0,5) E - s	<i>M.tuberculosis</i>
86	45/06	277	H - s R - s S - r E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
87	46/06	278	H - r R - r S - r E - s	H- r >ou =1 R - r (0,5) S - r (4) E - s	<i>M.tuberculosis</i>

88	49/06	260	H - s R - s S - r E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M.tuberculosis</i>
----	--------------	-----	----------------------------------	---	-----------------------

Siglas

H – isoniazida;

R – rifampicina;

S – estreptomicina

E – etambutol.

s - sensível

r – resistente.

Negrito – houve discordância entre os resultados no método das proporções e REMA.

ANEXO 2 - Resultados de testes de sensibilidade a antimicobacterianos pelos métodos das proporções e REMA de isolados clínicos não *M. tuberculosis* identificados pelo PRA *hsp65*.

Nº da cepa	Nº do Ensaio	Nº da cultura	Método proporções	REMA	Identificação
1*	180/05	2053	H - r R - s S - r E - s	H - r > ou = 1 R - r (0,125) S - r (0,250) E - r > ou = 16	<i>M. szulgai</i>
2*	224/05	2460	H - r R - r S - r E - s	H - r > ou = 1 R - r (0,250) S - s E - r > ou = 16	<i>M. kansasii</i>
3*	238/05	2621	H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r > ou = 1 S - r > ou = 8 E - r > ou = 16	<i>M. abscessus</i>
4*	306/05	3642	H - r R - s S - r E - r	H - r > ou = 1 R - s S - r (0,5) E - R > ou = 16	<i>M. kansasii</i>
5*	306/05	3661	H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r (0,125) S - r (2) E - r > ou = 16	<i>M. kansasii</i>
6*	318/05	3760	H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r (0,125) S - r (2) E - r > ou = 16	<i>M. kansasii</i>
7*	326/05	3831	H - r R - r S - r E - r	H - r (0,5) R - r (0,125) S - r (2) E - r (4)	<i>M. kansasii</i>
8*	326/05	4607	H - r R - r S - r E - r	H - r (0,5) R - r (0,25) S - r (4) E - r (4)	<i>M. kansasii</i>
9*	351/05	4532	H - r R - s S - r E - s	H - r (0,125) R - s S - r (2) E - s	<i>M. kansasii</i>
10*	368/06	4701	H - r R - r S - s E - r	H - r (0,06) R - r (0,5) S - s E - r > ou = 16	<i>M. abscessus</i>
11*	386/06	4785	H - s R - s S - s E - s	H - s R - s S - s E - s	<i>M. abscessus</i>
12*	37/06	616	H - r R - r S - r E - r	H - r > ou = 1 R - r > ou = 1 S - r > ou = 8 E - r > ou = 16	<i>M. abscessus</i>

Siglas

H – isoniazida;

R – rifampicina;

S – estreptomicina

E – etambutol.

s - sensível

r – resistente.

Negrito – houve discordância entre os resultados no método das proporções e REMA.