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

Análise de mutações nos genes relacionados com resistência a
isoniazida (INH) em isolados clínicos de
Mycobacterium tuberculosis de origem brasileira

Rosilene Fressatti Cardoso

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata

São Paulo
2003

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

**Análise de mutações nos genes relacionados com resistência a
isoniazida (INH) em isolados clínicos de
Mycobacterium tuberculosis de origem brasileira**

Rosilene Fressatti Cardoso

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientador:
Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata**

**São Paulo
2003**

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005132

Ficha Catalográfica

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

Cardoso, Rosilene Fressatti
C268a Análise de mutações nos genes relacionados com resistência
a isoniazida (INH) em isolados clínicos de *Mycobacterium
tuberculosis* de origem brasileira / Rosilene Fressatti Cardoso. --
São Paulo, 2003.
135p.

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

Orientador: Hirata, Mário Hiroyuki

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

616.0756-9 CDD

Rosilene Fressatti Cardoso

**Análise de mutações nos genes relacionados com resistência
a isoniazida (INH) em isolados clínicos de
Mycobacterium tuberculosis de origem brasileira**

**Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor**

**Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata
orientador/presidente**

**Profa. Dra. Elsa Massae Mamizuka
1º. examinador**

**Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite
2º. examinador**

**Profa. Dra. Sylvia Luisa Pincherle Cardoso Leão
3º. examinador**

**Prof. Dr. Fernando Augusto Fiúza de Melo
4º. examinador**

São Paulo, 20 de fevereiro de 2003

Dedico esse trabalho a.....

DEUS

As únicas pegadas que vi em certos momentos eram Dele.....

***Nos momentos difíceis Ele me amparou e me carregou para
continuar a caminhada.***

Ao meu esposo

Marco Antonio,

*As dificuldades surgiram no início de tudo,
fora de nosso país e em nosso lar.*

*Caminhamos juntos, mas posso dizer que seus passos estavam a frente
direcionando os meus a todo tempo com muito carinho e respeito.*

Compreensão pelas horas de ausência nunca faltou.

Amor foi a solução nos momentos difíceis.

Aos meus queridos filhos

Andréia, Carolina e Marcelo,

A alegria de viver, os estímulos diários

Razão para tudo.....

*A meus pais Tertuliano (sei que em sua morada junto ao Senhor,
está orgulhoso do meu trabalho) e Terezinha,
pelo eterno Carinho, ensinamentos, estímulo,
respeito e amor*

*Aos meus sogros
João Antonio e Wilma,
que me apoiaram carinhosamente,
de inúmeras maneiras durante
esta importante etapa na minha vida.*

*Ao meu orientador,
Prof. Assoc. Mário H. Hirata.
Com todo meu respeito,
admiração como profissional e ser humano
e imensa gratidão pelos ensinamentos.*

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico e Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análise Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo (USP), e Laboratório de pesquisa em tuberculose do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta – U.S.A.

Diversas pessoas colaboraram de forma direta ou indireta na execução deste estudo. O tempo decorrido desde a idéia até o esforço final deste trabalho pode ter deixado de citar alguém, mas a eles a gratidão é a mesma.

Dirijo meus agradecimentos:

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu diretor Prof. Tit. Jorge Mancini Filho.

Ao Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, em especial meu muito obrigado aos amigos e colegas de trabalho da disciplina de Bacteriologia Clínica e Tópicos em Micologia, Virologia e Entomologia do curso de Farmácia; Professores Francisco Herrero, Vera Lúcia Dias Siqueira, Jane Martha Graton Mikcha e Terezinha I. E. Svidzinski, as Farmacêuticas Sonia A. S. Bertão, Rúbia Andréa Falheiros, Eliana Guilhermetti, e Elisa Keiko Hirayama e a Química Aparecida Donizeti Bidóia pelo constante apoio, oportunidade e incentivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido para a realização do presente trabalho.

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

À Prof. 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.

Aos professores 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.

À Profa. Assoc. Rosário D. Crespo Hirata pelo exemplo que nos é diariamente de dedicação a carreira profissional e acadêmica, confiança, carinho e respeito.

À Profa. Dra. Elsa Massae Mamizuka pelo incentivo e amizade durante esses anos.

À Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite com inestimável gratidão pelo apoio, ensinamentos, incentivo, valorosas sugestões, colaboração e sobretudo pela grande amizade.

Ao Dr. Fernando Fiúza de Melo do Instituto Clemente Ferreira – S.P. pelas sugestões e concessão de isolados de *M. tuberculosis*.

As amigas dos Laboratórios de Micobactérias do IAL de Ribeirão Preto e Sorocaba, Daisy Nakamura Sato e Maria de Lurdes Shikama pela amizade, auxílio em obtenção de reagentes e concessão de isolados de *M. tuberculosis*.

A amiga Marli Matiko Anraku de Campos pela ajuda quando do início dos trabalhos no Laboratório de Microbiologia Clínica da FCF – USP.

Ao Dr. Robert Cannon Cooksey pelos ensinamentos na área de micobacteriologia e pela oportunidade de finalizar este trabalho no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta – USA.

Ao Pesquisador Glenn P. Morlock do CDC, pela calorosa recepção em minha estada no CDC e pelas valorosas sugestões e auxílio técnico para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Hamilton Massayuki Hinuy, Elizabeth Cecília Rodriguez Guzmán, Sun Ok Yoon, Luís Antonio Salazar, Simone Cohen Sorkin, Heluih Atta Abdalah, Silvério Teixeira dos Santos, Márcia Keila Nakamura, Ivanise Marina Moretti Rebecchi, Fabiana Cristina Pereira, Vladmir Pereira, Leila Badreddini, André Ducat Luchessi, Rosângela Verlengia, Andréa Luciana de Araújo Cunha, Maria Fernanda Pimentel de Carvalho, Uana Miguel Jorge, Gladys Mossirer.

Aos inesquecíveis amigos do “Grupo da Tuberculose” do laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF-USP: Patrícia Barco, Letícia Cecon e Francisco José Forestiero, pelo auxílio, apoio, carinho e incentivo. Agradeço de todo o coração.

Aos amigos Cláudia Pappas (Geórgia State University), Steve Pappas (CDC) e Leda Bassite (CDC) pela ajuda que deram a mim e minha família durante nossa estada em Atlanta, Geórgia, USA. Meu muito obrigado.

Às funcionárias da Secretaria do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Márcia Cristina Caramico, Sueli Providelo.

Aos pacientes com tuberculose que de forma incomparável e anônima contribuíram para este estudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas.....	xi
Lista de figuras.....	xiv
Lista de tabelas.....	xvi
Resumo.....	xix
Abstract.....	xx
1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	19
3 Material e Métodos.....	22
3.1 Amostras bacterianas.....	23
3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica em microplaca utilizando o Alamar Blue como agente revelador (MABA)...	24
3.3 Caracterização molecular dos isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
3.4 Triagem de mutações em genes relacionados com resistência a INH, pela técnica de PCR-SSCP.....	35
3.5 Detecção de mutações nos genes <i>katG</i> , <i>kasA</i> , <i>inhA</i> e região intergênica <i>oxyR-ahpC</i> por seqüenciamento semi-automático.....	44
4 Resultados.....	56
4.1 Resultados da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da microdiluição em placa (MABA).....	57
4.2 Caracterização molecular dos isolados de <i>M. tuberculosis</i>	58
4.3 Triagem de mutações nos genes relacionados com resistência a INH em isolados de <i>M. tuberculosis</i> pela técnica de PCR-SSCP.....	60
4.4 Alterações moleculares identificadas nos genes relacionados com resistência a INH em isolados de <i>M. tuberculosis</i> pela técnica de seqüenciamento semi-automático.....	74
4.5 Avaliação da associação entre mutações no gene <i>kasA</i> e resistência a INH em isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	77

4.6 Relação entre os valores da CIM e as mutações encontradas nos isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a INH.....	78
4.7 Análise da concordância entre a técnica de SSCP e a seqüenciamento semi-automático para detecção de mutações em genes relacionados com resistência a INH em <i>M. tuberculosis</i>	80
5. Discussão.....	83
6. Conclusões.....	106
7. Referências bibliográficas.....	109
8. Anexos.....	125
8.1 Procedência, valores da CIM e padrões de “Spoligotyping” dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> sensíveis e resistentes a INH.....	126

Lista de abreviaturas

A	adenina
C	citossina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIM	concentração inibitória mínima
dATP	desoxiadenuina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
ddNTPs	didesoxinucleotídeo trifosfato
dGTP	desoxiguanina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
DR	seqüências de repetição direta
dTTP	desoxitimina trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EMB	etambutol
ETH	etionamida
g	grama
G	guanina
HCl	ácido clorídrico
INH	isoniazida
Kb	kilobase
KCl	cloreto de potássio

kDa	kilodalton
L-J	meio de cultivo Löwenstein-Jensen
MABA	Micrplate Alamar Blue Assay
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minuto
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
mL	mililitro
mM	milimolar
NAD	Nicotinamida dinucleotídeo
NCID-DAST-TB/ Mycobacteriology	National Center for Infectious Disease- Division of AIDS, STD and TB laboratory Research/ Mycobacteriology Branch
NG	sem crescimento
nM	nanomolar
OADC	ácido oléico, albumina, dextrose e catalase
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PZA	pirazinamida
RMP	rifampicina

RNA _m	RNA mensageiro
S	sensível
SDS	dodecil sulfato de sódio
SM	streptomicina
SSCP	polimorfismo de conformação de fita simples
SSPE	solução tampão de sódio-fosfato-EDTA
T	timina
U/mL	Unidade por mililitro
UV	ultra violeta
V	Volts

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema representativo das regiões em que os iniciadores se localizam para amplificação das regiões adjacentes aos codons 315 e 463 do gene <i>katG</i> , pela PCR com finalidade de triagem de mutações por SSCP.....	38
Figura 2. Esquema representativo das regiões em que os iniciadores se localizam para amplificação dos fragmentos do gene de <i>InhA</i> pela PCR com a finalidade de triagem de mutação por SSCP.....	38
Figura 3. Esquema representativo das regiões em que os iniciadores se localizam para amplificação dos fragmentos do gene <i>KasA</i> pela PCR com a finalidade de triagem de mutação por SSCP em toda extensão do gene.....	39
Figura 4. Esquema representativo das regiões em que os iniciadores se localizam para amplificação do fragmento inter gene <i>ahpC</i> e <i>oxyR</i> pela PCR com a finalidade de triagem de mutação por SSCP.....	39
Figura 5. Representação da CIM pela técnica do MABA após revelação com Alamar Blue.....	57
Figura 6. Foto do filme de raio X mostrando uma membrana revelada da reação de hibridação da técnica de "Spoligotyping".....	59
Figura 7. Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos fragmentos de 145 pb e 162 pb amplificados pela PCR das regiões adjacentes aos códons 315 (A) e 463 (B) do gene <i>katG</i>	60
Figura 8. Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pela PCR das regiões promotora (A) e adjacentes aos códons 16 (B) e 94 (C) do gene <i>inhA</i>	61
Figura 9. Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pela PCR da região intergênica <i>oxyR-ahpC</i>	61
Figura 10. Fotografia do gel de agarose a 1,5% dos 6 fragmentos amplificados pela PCR do gene <i>kasA</i>	62
Figura 11. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando iniciadores que flanqueiam a região que contém o codon 315 do gene <i>katG</i>	65

Figura 12. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata, representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores que flanqueiam a região que contém o codon 463 do gene <i>katG</i>	66
Figura 13. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores que flanqueiam a região promotora do gene <i>inhA</i>	67
Figura 14. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores que flanqueiam a região que contém o codon 16 do gene <i>inhA</i>	67
Figura 15. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores que flanqueiam a região que contém o codon 94 do gene <i>inhA</i>	68
Figura 16. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores que flanqueiam a região intergênica <i>oxyR-ahpC</i>	69
Figura 17. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores <i>kasA</i> 1F e <i>kasA</i> 1R.....	70
Figura 18. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores <i>kasA</i> 2F e <i>kasA</i> 2R.....	70
Figura 19. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores <i>kasA</i> 3F e <i>kasA</i> 3R.....	71
Figura 20. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata, representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores <i>kasA</i> 4F e <i>kasA</i> 4R.....	72
Figura 21. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores <i>kasA</i> 5F e <i>kasA</i> 5R, do gene <i>kasA</i>	73
Figura 22. Fotografia do gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores <i>kasA</i> 6F e <i>kasA</i> 6R do gene <i>kasA</i>	73

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1. Concentração de reagentes empregados na amplificação do locus DR para realização de "Spoligotyping".....	33
Tabela 2. Iniciadores usados na PCR para realização da SSCP para detectar mutação nos genes <i>katG</i> , <i>inhA</i> (regiões promotora e estrutural), <i>kasA</i> e região intergênica <i>oxyR-ahpC</i>	37
Tabela 3. Programas utilizados para amplificar as regiões gênicas adjacentes aos códons 315 e 463 do gene <i>katG</i> , regiões promotora e adjacentes aos códons 16 e 94 do gene <i>inhA</i> , região intergênica <i>oxyR-ahpC</i> e o gene <i>kasA</i> em toda a sua extensão em seis fragmentos de DNA.....	41
Tabela 4. Iniciadores usados para realização de PCR e seqüenciamento do gene <i>katG</i> em todaa sua extensão.....	46
Tabela 5. Iniciadores usados para realização da PCR e seqüenciamento das regiões promotora e estrutural do gene <i>inhA</i> , região adjacente ao codon 315 do gene <i>katG</i> e região intergênica <i>oxyR-ahpC</i>	47
Tabela 6. Iniciadores utilizados na PCR e seqüenciamento de toda extensão do gene <i>kasA</i>	47
Tabela 7. Concentrações dos reagentes usados para a realização da PCR utilizando Kit Hot Start Master Mix (Qiagen) para posterior seqüenciamento do produto da PCR.....	48
Tabela 8. Programa utilizado para amplificar a região adjacente ao codon 315 do gene <i>katG</i> utilizando os iniciadores BC 48 e BC 51R para posterior seqüenciamento do produto.....	48
Tabela 9. Programa utilizado para amplificar a região promotora e regiões adjacentes aos codons 16 e 94 do gene <i>inhA</i> e região promotora de <i>ahpC</i> utilizando os iniciadores <i>inhA</i> 1 e <i>inhA</i> 2, <i>inhA</i> 5 e <i>inhA</i> 6 e <i>ahpC</i> 1 e <i>ahpC</i> 2 respectivamente.....	49
Tabela 10. Estratégia estabelecida para realização da PCR para seqüenciamento do gene <i>katG</i> em toda a sua extensão.....	49
Tabela 11. Programa utilizado para realizar as PCRs <i>katG</i> #1, <i>katG</i> #2 e <i>katG</i> #3 do gene <i>katG</i> utilizando os iniciadores <i>katG</i> ~ 1 e <i>katG</i> ~ 5, <i>katG</i> ~ 4 e <i>katG</i> ~ 9 e <i>katG</i> ~ 8 e <i>katG</i> ~ 13 respectivamente.....	50

Tabela 12. Programa utilizado para realizar a PCR katG #4 do gene <i>katG</i> utilizando os iniciadores katG ~ 12 e katG ~ 14.....	50
Tabela 13. Programa utilizado para amplificar as regiões kasA 3, kasA 4 e kasA 5 utilizando os iniciadores kasA ~ 1 e kasA ~ 5, kaA ~ 4 e kasA ~ 8.....	51
Tabela 14. Concentrações dos reagentes para a reação de seqüenciamento semi-automático de produto de PCR.....	53
Tabela 15. Estratégia usada para seqüenciamento do gene <i>katG</i> em toda sua extensão.....	53
Tabela 16. Distribuição relativa em relação a concentração inibitória da INH, para os 97 isolados resistentes de <i>M. tuberculosis</i> , pelo método da microdiluição em placa utilizando Alamar Blue como agente revelador.....	58
Tabela 17. Resultado da otimização das condições para realização da técnica de SSCP.....	64
Tabela 18. Porcentagem de isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a INH que apresentam mutações no codon 315 e na região adjacente ao codon 315 no gene <i>katG</i> , regiões promotora e adjacente aos códons 16 e 94 do gene <i>inhA</i> , região intergênica <i>oxyR-ahpC</i> e gene <i>kasA</i>	75
Tabela 19. Relação das mutações identificadas nos genes <i>katG</i> , <i>kasA</i> , <i>inhA</i> e regiões promotoras de <i>inhA</i> e <i>ahpC</i> , em 97 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a INH.....	76
Tabela 20. Relação das mutações identificadas nos genes <i>kasA</i> e <i>ahpC</i> em 60 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> sensíveis a INH.....	77
Tabela 21. Número total de mutações encontradas no gene <i>kasA</i> em 157 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	77
Tabela 22. CIM para INH e número total de mutações encontradas nos genes <i>katG</i> , <i>inhA</i> e região intergênica <i>oxyR-ahpC</i> em 97 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a INH.....	79
Tabela 23. Percentual de isolados de <i>M. tuberculosis</i> que apresentaram CIM com valor acima de 0,5 µg/ml em relação ao perfil de SSCP obtido para os genes <i>katG</i> , <i>inhA</i> , e região intergênica <i>oxyR-ahpC</i> para 97 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a INH.....	79

Tabela 24. Porcentagem de concordância entre o perfil de PCR-SSCP e o seqüenciamento para detectar mutações no codon 315 do gene <i>KatG</i> para os 97 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a INH.....	80
Tabela 25. Porcentagem de concordância entre PCR-SSCP e o seqüenciamento para detectar mutações na região promotora do gene <i>inhA</i> para os 97 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a INH.....	81
Tabela 26. Porcentagem de concordância entre PCR-SSCP e o seqüenciamento para detectar mutações na região estrutural (região 16 e 94) do gene <i>inhA</i> , para os 97 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a INH.....	81
Tabela 27. Porcentagem de concordância entre PCR-SSCP e o seqüenciamento para detectar mutações na região intergênica <i>oxyR-ahpC</i> , para os 97 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a INH.....	82

RESUMO

No presente estudo realizou-se a triagem para detecção de mutações nos genes *katG*, *kasA*, *inhA*, e região intergênica *oxyR-ahpC* pela PCR-SSCP e a confirmação por seqüenciamento semi-automático, em 97 isolados resistentes e 60 sensíveis a INH, de *M. tuberculosis* de origem brasileira. Foi também, investigado a freqüência destas mutações. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os isolados resistentes foi realizada pela técnica de Alamar Blue (MABA). A caracterização molecular dos isolados sensíveis e resistentes a INH, foi feita por "Spoligotyping" da região hipervariável locus DR. Foi obtido 40 diferentes padrões de "Spoligotyping" para os 97 isolados clínicos resistentes e um total de 30 para os 60 isolados sensíveis de *M. tuberculosis*. Nenhum isolado estudado apresentou o gene *katG* deletado na íntegra. No entanto, encontrou-se um isolado com deleção na região 3' neste gene e uma alta porcentagem de mutação (85,6%); principalmente no codon 315 (61,9%). Foram detectadas 25 novas mutações ainda não descritas na literatura entre os isolados resistentes, no gene *KatG*, assim como 25,8% dos isolados resistentes apresentaram mutação na região promotora e 5,82% na região estrutural do gene *inhA* e 10,3% na região intergênica *oxyR-ahpC* sendo uma mutação (-48) ainda não descrita na literatura. No gene *kasA*, foram observadas mutações tanto em isolados sensíveis como em resistentes a INH. A mutação mais freqüente observada nesse gene foi no codon 269 que causou a alteração G269S (23,7%). Algumas mutações silenciosas, em menor porcentagem, foram detectadas somente nos isolados sensíveis. A técnica de PCR-SSCP demonstrou boa sensibilidade, detectando 90,7% das mutações analisando 5 regiões gênicas (região adjacente ao codon 315 do gene *katG*, região promotora e estrutural do gene *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC*). Concordância de 100% foi verificado entre as técnicas de PCR-SSCP e de seqüenciamento. Portanto pode-se concluir que a triagem por PCR-SSCP pode ser utilizada com segurança para essa finalidade.

ABSTRACT

In the present study the mutations frequencies in the *katG*, *kasA*, *inhA* genes and *oxyR-ahpC* intergenic region of 97 resistant and 60 sensitive *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil were investigated. The mutations screening were carried out by PCR-SSCP and confirmed by automated sequencing. The minimal inhibitory concentration for INH was done by the microplate Alamar Blue Assay (MABA). The molecular differentiation of INH resistant and sensitive isolates was carried out by Spoligotyping of the locus DR. We found 40 different Spoligotyping patterns when analyzing 97 INH resistant clinical isolates and 30 in 60 INH sensitive isolates. Our data showed no resistant isolates had a complete deletion of the *katG* gene. However, one resistant isolate that had a deletion at region 3' in *katG* gene was found and a high percentage of mutation in this gene (85,6%) mainly at codon 315 (61,9%). Twenty-five new mutations previously not described in the literature, were detected in *katG* gene in all resistant isolates studied and 25,8% had mutation in *inhA* promoter region, 5,82% had mutation in *inhA* structural region and 10,3% at *oxyR-ahpC* intergenic region where one of this is a new mutation (-48) previously not described in the literature. It was observed in *kasA* gene mutation in resistant and sensitive isolates. The most frequent mutation observed in *kasA* gene was at codon 269 that will cause alteration G269S (23,7%). Other silent mutations were detected only in INH sensitive isolates, however with a low frequency. PCR-SSCP showed good sensibility (90.7%) to detect mutations in INH resistant isolates, analyzing 5 genic regions (315 codon region of *katG* gene, *inhA* promoter and *inhA* structural region and *oxyR-ahpC* intergenic region) by PCR-SSCP. PCR-SSCP showed agreement in 100% when compared to sequencing. We can thus conclude that mutation screening by PCR-SSCP can be used to detect resistance to INH in *M. tuberculosis*.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é um problema de saúde pública em países em desenvolvimento e em países industrializados. É doença de evolução crônica causada por algumas micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), sendo considerada a doença infecto-contagiosa de maior mortalidade isoladamente (SHINNICK & GOOD, 1994; SNIDER *et al.*, 1994). Porém, o principal responsável por essa patologia é o *M. tuberculosis*. Acomete principalmente pessoas na faixa etária correspondente a plena capacidade produtiva, afetando os setores de mais baixa renda da população vindo a acarretar enorme prejuízo econômico ao país (BRASIL, Ministério da Saúde, 1992).

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), realizada em 1990, indicam que um terço da população mundial encontra-se infectada pelo *M. tuberculosis*. São descritos oito milhões de casos novos da doença anualmente, dos quais 7,6 milhões ocorrem em países em desenvolvimento acarretando aproximadamente três milhões de óbitos por ano (DUTT & STEAD, 1999).

Os dados nacionais apontam que cerca de 25 a 30% da população brasileira encontra-se infectada pelo bacilo da tuberculose (aproximadamente 40 milhões de pessoas). Desses, cerca de 90 mil casos clínicos de tuberculose ocorrem anualmente, levando a cinco mil óbitos. Em algumas regiões do Brasil, o número de casos notificados e de mortalidade por tuberculose aumentou significativamente. No Estado de São Paulo, foram notificados nos anos de 1998, 1999 e 2000, 18.112, 18.675 e 15792 casos novos respectivamente, levando a 1.521 mortes só no ano de 1998 (Centro de Vigilância Epidemiológica - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2002).

Uma vez inalado o bacilo, surge um foco inicial da doença nos pulmões em decorrência da produção da infecção primária da tuberculose. Essa fase passa despercebida em 90 % dos indivíduos infectados, levando a um estado latente, ou a regressão do foco primário e cura espontânea da lesão. Em torno de 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a doença, seja

ela pulmonar ou extra-pulmonar, em algum estágio de sua vida em que as defesas orgânicas tomem-se debilitadas (FIÚZA DE MELO & AFIÚNE, 1993; SMITH & MOSS, 1994).

Até a década de 40 a cura dos doentes com tuberculose era extremamente limitada, baseando-se principalmente em uma super alimentação e repouso. Este quadro apresentava aos pacientes uma difícil realidade e perspectiva, onde 50% dos doentes iam a óbito, 25% tornavam-se crônicos ativos e o restante apresentava cura espontânea (BRASIL, Ministério da Saúde, 1984 ; PALACI *et al.*, 1997).

Com o surgimento dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose, a partir do final dos anos 40, a eficácia do tratamento chegou a aproximadamente 100% desde que obedecidos os princípios da moderna quimioterapia. Os índices de mortalidade caíram de forma acentuada no mundo, porém nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, isto tenha continuado com índices acima das expectativas considerando as precárias condições sócio-econômicas e programas de controle da tuberculose deficientes (ROSEMBERG, 1999). Nos EUA, segundo dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) - Atlanta, houve declínio no número de casos de tuberculose entre 1953 e 1985, porém a partir de 1986 ocorreu um aumento relativo, e alguns, com agravante da presença de cepas resistentes aos fármacos usados para o tratamento, elevando os índices de casos fatais da doença (SNIDER *et al.*, 1994; COHN *et al.*, 1997).

Nos países do continente americano, vários fatores parecem contribuir para o aumento do número de casos de tuberculose. Fazem parte desses fatores: a crise econômica, as dificuldades de acesso aos serviços de saúde, a aglomeração de indivíduos na periferia dos grandes centros, a negligência por parte de autoridades competentes face a um problema que vinha diminuindo a três décadas e também a associação da pandemia do vírus responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS/SIDA (OPS/Boletim Epidemiológico, 1998; FÄTKENHEUER *et al.*, 1999; HIJJAR *et al.*, 2001).

A associação da AIDS também veio contribuir a partir de 1981 para um crescente número de casos notificados de tuberculose, entre eles os casos extra-pulmonares, em países desenvolvidos como nos em desenvolvimento. A associação AIDS/Tuberculose constitui atualmente um sério problema de saúde pública levando a um aumento da morbidade principalmente dos casos resistentes ao tratamento e com elevada mortalidade (PINTO *et al.*, 1996; FÄTKENHEUER *et al.*, 1999; HIJJAR *et al.*, 2001; ESPINAL *et al.*, 2001).

O paciente com tuberculose e sem história de tratamento anterior é submetido a uma terapia inicial intensiva de 6 meses (Esquema I) preconizada pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Este esquema de tratamento compreende o uso combinado de três fármacos: Rifampicina (RMP), Isoniazida (INH) e Pirazinamida (PZA), durante 2 meses (fase de ataque) a fim de garantir que mutantes a apenas um fármaco não proliferem. Nos quatro meses seguintes (fase de manutenção), somente a associação RMP e INH é administrada para eliminar a presença de algum bacilo persistente não eliminado nos dois primeiros meses de tratamento. Outros esquemas terapêuticos estão preconizados, sendo utilizados dependendo da forma clínica da doença e da presença de casos de tuberculose resistentes ao Esquema I (BRASIL-Ministério da Saúde 1992; FIÚZA DE MELO *et al.*, 1993).

RMP e INH são os fármacos mais potentes utilizados no tratamento da tuberculose, podendo eliminar mais de 99% dos bacilos nos dois primeiros meses de tratamento. Porém a resistência a esses fármacos tem aumentado significativamente devido à intervenção inadequada na mutação espontânea do *M. tuberculosis*. Normalmente a taxa de mutação espontânea, que resulta na presença de uma pequena proporção de microrganismos resistentes a determinado fármaco independentemente de uma exposição prévia, pode variar de acordo com a concentração e o tipo do fármaco. Numa população selvagem de *M. tuberculosis* são encontrados mutantes resistentes para INH e para RMP na ordem de 10^{-6} e 10^{-8} respectivamente. Esta proporção não é afetada pela presença do fármaco, pois estes não são mutagênicos, nem induzem o aparecimento de determinantes de resistência (BARRERA, 1994 ; PALACI *et al.*, 1997).

Embora essas mutações sejam eventos quantitativamente raros, quando ocorrem em numerosas populações de micobactérias e sobre pressão seletiva pelo uso de um único fármaco no tratamento, podem favorecer ao predomínio de cepas resistentes sobre as sensíveis. Portanto a administração incorreta desses fármacos induz a seleção de população de bacilos resistentes (BARRERA, 1994).

A administração combinada de fármacos permite eliminar os mutantes resistentes a um fármaco específico, aumentando a eficácia do tratamento (CANETTI, 1995; PALACI *et al.*, 1997). O tratamento com apenas uma droga ou com várias, porém administradas irregularmente, gera a resistência adquirida ou secundária. Em decorrência da resistência adquirida surge a resistência primária que ocorre em indivíduos que se contaminam com *M. tuberculosis* já resistentes (FIÚZA DE MELO *et al.*, 1993; MITCHINSON, 1998).

No processo de desenvolvimento de resistência aos fármacos antituberculose, a epidemia da AIDS vem causando impacto significativo, porém até o momento não existem evidências de que o vírus HIV possa potencializar biologicamente a resistência aos fármacos, das cepas de *M. tuberculosis* (HIJJAR *et al.*, 1994). A associação da AIDS com maior prevalência e transmissibilidade das formas resistentes da doença se explica por fatores epidemiológicos e por certas deficiências no controle dos casos. Nos indivíduos aidéticos concentram-se várias circunstâncias favoráveis ao aparecimento de uma forma da doença que é a tuberculose Multidrogarresistente (TB-MDR), causada por cepas resistentes a mais de uma das drogas usadas no tratamento (ROSEMBERG, 1999).

Na literatura internacional, o conceito de TB-MDR, diz respeito a cepas de *M. tuberculosis* com resistência a INH e RMP (KAYE & FRIEDEN, 1996). No Brasil este conceito refere-se aos casos que apresentam falência de tratamento quando da utilização dos esquemas I e III preconizados pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), ou quando a cepa é resistente a INH e RMP e ainda a estreptomicina (SM) e/ou etambutol (EMB) (FIÚZA DE MELO *et al.*, 1993).

Nos EUA, a frequência de isolamento de *M. tuberculosis* resistente a um ou mais fármacos aumentou de 7 para 14,2% na última década. Em Nova York, 3% dos isolados apresentavam resistência a um dos fármacos e 19% a dois dos fármacos mais importantes no tratamento da tuberculose, INH e RMP (MORRIS & ROUSE, 1996).

Segundo levantamento recente, realizado pela Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária e Centro de Referência Prof. Hélio Fraga - Rio de Janeiro, a resistência primária no Brasil é de 3,8% para INH, 0,2% para RMP isoladamente, e de 0,9% a esses dois fármacos simultaneamente. Quanto à resistência secundária, registrou-se 4,2% para INH, 0,6% para RMP e 5,9% para os dois simultaneamente (ROSEMBERG, 1999).

No Brasil, a resistência aos fármacos antituberculose está relacionada principalmente ao uso irregular de medicamentos, alta taxa de abandono do tratamento de muitos pacientes ainda com doença ativa, e também devido a prescrições inadequadas (FIÚZA DE MELO *et al.*, 1993).

Até o momento, foram identificadas algumas das características constitutivas que determinam a resistência generalizada, intrínseca das micobactérias aos antibióticos de amplo espectro e das micobactérias não tuberculosas (MNT) aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose. A principal característica é a constituição da parede celular das micobactérias, de alto conteúdo lipídico, que dificulta a penetração dos antibióticos no interior do bacilo. Também, alguns receptores e enzimas micobacterianas impedem a ação de antibióticos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos. As espécies do complexo *Mycobacterium avium-intracelulare* (MAC) possuem beta-lactamases e proteínas ligantes de penicilina de baixa afinidade. A resistência do *M. tuberculosis* e de algumas micobactérias de crescimento rápido aos beta-lactâmicos explica-se também pela presença de beta-lactamases constitutivas (BARRERA, 1994). Algumas micobactérias apresentam sistemas enzimáticos capazes de acetilar aminoglicosídeos, alterando o mecanismo de transporte destes antibióticos até os ribossomos, porém nem sempre esse fenômeno se constitui em resistência (ZHANG & YOUNG, 1994).

O mecanismo de ação da maioria dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose não é totalmente conhecido em detalhe até o momento (MUSSER, 1995). Porém considerável progresso no sentido de entender o mecanismo de ação e as bases moleculares de resistência aos fármacos mais potentes no tratamento da tuberculose, que são a INH e RMP, vem ocorrendo. De grande interesse as investigações estão mais focadas nas bases moleculares e bioquímicas dos mecanismos de ação e de resistência a INH (MUSSER, 1995; TELENTI, 1998;).

INH ou Hidrazida do ácido isonicotínico, que é um fármaco sintético e bactericida usado na linha de frente no tratamento e profilaxia da tuberculose foi sintetizada em 1912, mas sua poderosa atividade contra o bacilo da tuberculose foi descoberta e então introduzida no tratamento clínico da doença somente 40 anos após sua descoberta (HEYM *et al.*, 1999; SLAYDEN & BARRY III, 2000). A INH é altamente específica para *M. tuberculosis*, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0,02 a 0,2 µg/ml, sendo que para outras espécies do gênero é da ordem de 1 a 10 µg/mL (HIRATA *et al.*, 1997; MDLULI *et al.*, 1998b).

A estrutura química da INH é relativamente simples, contendo um anel de piridina e um grupo hidrazida que são responsáveis pela sua potente atividade quimioterápica contra todos os membros do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*) (HEYM *et al.*, 1999).

Ao contrário de sua estrutura química, o mecanismo de ação da INH parece não ser tão simples e não é totalmente entendido até os dias atuais. Segundo ZHANG *et al.* (1992) a INH é um pro-fármaco que é transportado para dentro da célula micobacteriana que está em crescimento ativo, por difusão passiva dependendo das condições de oxigênio e temperatura. Uma vez no interior da célula micobacteriana a INH é ativada pela enzima bacteriana catalase-peroxidase (KatG), codificada pelo gene *kafG*, a ácido isonicotínico e uma variedade de radicais reativos. Esses radicais incluem radicais de oxigênio (peróxido de hidrogênio, superóxido, peroxinitrito e radical hidroxil) e orgânicos tal como radical acyl isonicotínico.

Durante a ativação da INH, pela enzima KatG, os diversos radicais tóxicos formados podem causar danos a vários alvos micobacterianos que incluem a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA), carboidratos, lipídeos, metabolismo do NADH e os ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa α -ramificados e β -hidroxilados) que são os principais componentes da parede celular micobacteriana. Esta alteração na parede celular é que talvez torne a micobactéria sensível aos oxigênios reativos e outros fatores ambientais podendo levá-la a morte (ZHANG *et al.*, 1992; BARRERA, 1994; SOMOSKOVI *et al.*, 2001).

A relação direta entre a sensibilidade a INH e a atividade da enzima KatG, única enzima no bacilo da tuberculose capaz de ativar este fármaco, foi observada desde 1954, por Middlebrook em estudos de requerimento de crescimento de cepas resistentes a INH (HIRATA *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 1997).

Assim, estudos têm procurado determinar, no genoma do *M. tuberculosis*, as alterações que podem vir a expressar resistência aos fármacos convencionalmente utilizados no tratamento da tuberculose. A aplicação desses conhecimentos facilitará o desenvolvimento de métodos rápidos que permitirão, através de técnicas moleculares, evidenciar genes responsáveis pela resistência das micobactérias presentes nos espécimes clínicos e facilitar o desenvolvimento de novos quimioterápicos (MORRIS *et al.*, 1995; COOKSEY *et al.*, 1996b; NACHAMKIM *et al.*, 1997; TELENTI *et al.*, 1997; TEMESGEN *et al.*, 1997; COOKSEY *et al.*, 2000; FLUIT *et al.*, 2001; SIDDIQI *et al.*, 2002).

Em estudos moleculares preliminares verificou-se que o gene da catalase-peroxidase (*katG*) se encontrava deletado no cromossomo de uma cepa de *Mycobacterium smegmatis* resistente a uma alta concentração de isoniazida (CIM maior que 50 $\mu\text{g/mL}$) e a sua transformação com gene *katG* funcional de *M. tuberculosis* restaurou sua sensibilidade ao fármaco (ZHANG *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1993).

Análises por *Southern blot* de cepas resistentes a INH revelaram que a deleção completa do gene *katG* é um evento relativamente raro em *M.*

tuberculosis, observado em 10 a 20% dos casos isolados com catalase negativa, e que pequenas mutações pontuais eram a causa mais freqüente de inativação desse gene (STOECKLE *et al.*, 1993; QUÉMARD *et al.*, 1995). Estas mutações poderiam interromper ou alterar o gene, permitindo a produção de um produto inativo ou com atividade de catalase e peroxidase comprometida.

Análises iniciais de seqüências nucleotídicas do gene *katG* de cepas com resistência a INH, demonstrou que a alteração mais comum em cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH era a transversão de Guanina (G) para Timina (T) no codon 463 (ALTAMIRANO *et al.*, 1994; HEYM *et al.*, 1995; ROUSE *et al.*, 1995). Esta mutação que leva a substituição do aminoácido Arginina para Leucina (Arg463Leu) na proteína parece não afetar a atividade enzimática de KatG, uma vez que foi detectada também em cepas sensíveis a INH com atividade de catalase-peroxidase, e não pode ser usado como um indicador de resistência a INH (HASS *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1997; VAN DOORN *et al.*, 2001)

A substituição Arg463Leu está presente em várias cepas, principalmente em isolados da China, União Soviética e outras áreas da Ásia, sendo então considerada um polimorfismo genético em *M. tuberculosis* (RAMASWAMY & MUSSER, 1998).

Mutações em outras posições do gene *katG* já foram detectadas em isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH, entre elas a mais freqüente ocorre no codon 315, levando na maioria dos casos a troca do aminoácido Serina (AGC) para Treonina (ACC) (Ser315Thr) (COCKERILL III *et al.*, 1995; HASS *et al.*, 1997; MARTTILA *et al.*, 1998; WENGENACK *et al.*, 1998; VAN SOOLINGEN *et al.*, 2000; VAN RIE *et al.*, 2001; MOKROUSOV *et al.*, 2002a; MOKROUSOV *et al.*, 2002b). Outras alterações de bases nesse códon já foram observadas: ACA (Treonina), ATC (Isoleucina), AGA (Arginina) e CGC (Arginina) (RAMASWAMY & MUSSER, 1998).

Alguns estudos falharam em detectar mutações no códon 315 do gene *katG*, outros apresentaram baixa freqüência de cepas com essas mutações. A razão para tal diferença não está clara até o momento. No entanto, alguns autores retratam ocorrência de falhas na técnica de triagem de

mutações levando então, a um baixo percentual de isolados com mutações (MARTTILA *et al.*, 1996; MUSSER *et al.*, 1996; RAMASWAMY & MUSSER, 1998).

Segundo ZHANG & YOUNG (1994) e WENGENACK *et al.* (1998) uma explicação provável pela existência de grande número de mutações no codon 315, conferindo resistência a INH, é que o gene *katG* está situado em uma região do genoma micobacteriano altamente variável, contendo seqüências repetidas de DNA que provavelmente é a causa da alta instabilidade desta região.

WENGENACK *et al.* (1998) comparando a atividade de catalase da enzima codificada pelo gene sem mutação e da enzima com alteração do aminoácido Ser315Thr, observou redução da atividade de catalase de 6 vezes e a atividade de peroxidase de somente 2 vezes. Desta forma, a enzima com esta mutação provavelmente apresenta uma menor capacidade de converter o pro-fármaco INH a ácido isonicotínico e outros radicais, porém mantém ainda uma certa atividade de peroxidase.

Várias outras alterações gênicas em *katG* foram detectadas em diversos trabalhos, que foram compiladas por ZHANG & TELENTI (2000) (Quadro 1). Algumas dessas alterações, comprovadamente conferiram resistência a INH, como Arg104Leu, His108Gln, Asn138Ser, Leu148Arg, His270Gln, Thr275Pro, Ser315Thr, Trp321Gly e Asp381Gly, por testes moleculares de mutagênese sítio direcionada por alterar o gene *katG* em cepa sensível a INH (ROUSE *et al.*, 1996).

Quadro I. Relação de mutações encontradas nos gene *katG*, *kasA*, *inhA* (regiões promotora e estrutural) e região intergênica *oxyR-ahpC* em *M. tuberculosis*.

Região	Aminoácido ou nucleotídeo				
<i>katG</i> (62)	deleção completa	G125ins	V200stop	A350S	G593D
	M1A	M126I	E217del	I393N	L617del
	D63E	N138S,H	F252L	L463R	L619P
	A65ins	A139P	T262R	W477stop	G629S
	I71N	S140N,A	P275T	G485V	L634F
	N88R	D142A	E289del	D511del	S700P
	D94A	L148A	W30DG,stop	D513del	A710V
	G99E	L150A	S302R	R515C	A714P
	H108E,Q	Y155S	S315T,N,I,R,G	L521del	A717P
	A110V	S160L	W328L,C	Q525P	D735A
	G120del	A172T	I334T	F567S	
	A122del	T180C	I335T	A574V	
	G123del	W198stop	L336R	L587M,P	
Promotora	-81 -> g,a	-16 a -> g	-24 g -> t		
<i>mab-inhA</i> (6)	-15 c -> t	-17 g -> t	-55 a -> g		
<i>inhA</i> (6)	I16T	I147T	I95P		
	I21V,T	V78A	S94A		
Região intergênica	-55 -> g	-44 t -> a	-32 g -> a	-10 c -> a,t	+4 c -> t
	-46 g -> a	-42 t -> c	-30 c -> t	-9 g -> a	+33 g -> a
	-46 ins at	-39 c -> t	-15 c -> t	-6 g -> a	
	-45 c -> t	-34 t -> a,c	-12 c -> t	-4 a -> g	
<i>kasA</i> (6)	D66N	G269S	G387D		
	R121K	G312S	F413L		

Fonte: ZHANG & TELENTI (2000)

Segundo RAMASWAMY & MUSSER (1998) os resultados obtidos por ROUSE *et al.* (1996) sugerem que os resíduos de aminoácidos 104 e 108 estão localizados próximos ou no próprio sítio ativo da enzima e que os resíduos de aminoácidos 270, 275 e 315 parecem participar da ligação do grupo heme na enzima *katG* e mutações nestas regiões sem dúvida levariam a alterações na função da enzima KatG.

Devido a considerável variação de mutações reportadas em vários trabalhos, são necessários estudos adicionais sobre a variação alélica que

ocorre no gene *katG* em cepas de *M. tuberculosis* resistentes e sensíveis a INH para saber o real efeito de cada mutação na atividade de enzima KatG.

Aproximadamente 20% das cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH não apresentam mutações no gene *katG* que possam ser responsabilizadas por causar resistência a esse fármaco e outros mecanismos tem sido estudados e propostos de forma a explicar esta resistência (HEYM *et al.*, 1999; RATTAN *et al.*, 1998). A ligação entre resistência a INH e a síntese de ácidos micólicos foi estabelecida desde 1953 através das observações feitas por KOCH-WESER e colaboradores que, as cepas de *M. tuberculosis* tratadas com INH perdiam a sua propriedade de álcool-ácido resistência (SACCHETTINI & BLANCHARD, 1996).

Esta capacidade peculiar das células micobacterianas em reter o corante carbolfucsina, mesmo quando tratada com uma mistura de álcool-ácido, é uma característica dos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* e muito usada no diagnóstico da tuberculose. Esta propriedade se baseia no fato das micobactérias formarem um complexo estável com a carbolfucsina e os ácidos micólicos, covalentemente ligados ao polímero de arabino galactana na parede celular das micobactérias, e reterem o corante não permitindo sua eliminação quando do tratamento com uma mistura de etanol 95% e ácido clorídrico 3% (SMITHWICK, 1976; METCHOCK, 1999).

Somente dezessete anos mais tarde, com os estudos realizados por WINDER & COLLINS em 1970, TAKAYAMA e colaboradores em 1972; WANG & TAKAYAMA em 1972; TAKAYAMA e colaboradores em 1975 é que começaram os trabalhos relacionando a ação da INH com a inibição da síntese de ácidos micólicos da parede celular do *M. tuberculosis* (SACCHETTINI & BLANCHARD, 1996)

A ligação entre resistência a INH, síntese de ácidos micólico e a proporção de NAD foi identificada inicialmente pelos trabalhos realizados por BANERJEE *et al.* (1994) que relacionou a enzima enoyl ACP redutase NADH dependente (InhA), de 32 kDa, que catalisa as primeiras etapas da biossíntese de ácidos micólicos, como alvo para a INH já ativada pela enzima KatG (MARRAKCHI *et al.*, 2000).

Testes bioquímicos sugerem que um dos radicais tóxicos originado da ativação da INH inibe diretamente a enzima InhA, codificada pelo gene *inhA*, que desempenha importante função na fase inicial da síntese de ácidos micólicos (HEYM *et al.*, 1999). Um aspecto interessante, relacionado com esse gene, é que a resistência a INH é algumas vezes acompanhada de resistência a etionamida (ETH). A ETH é um fármaco estruturalmente relacionado com INH, e parece inibir também, a síntese de ácidos micólicos. Portanto, a enzima codificada pelo gene *inhA* pode representar um alvo comum para ambos os fármacos, apesar da resistência cruzada ser observada em uma minoria das cepas (BANERJEE *et al.*, 1994).

Estudos iniciais da sequência do gene *inhA* isolado de *M. smegmatis* e *M. bovis* resistentes a INH revelou mutação pontual que leva a conversão do aminoácido serina em alanina na posição 94 (Ser94Ala) da sequência polipeptídica (BANERJEE *et al.*, 1994).

KAPUR *et al.* (1995) em estudo com 37 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH, incluindo algumas com resistência concomitante a INH e ETH, observou apenas uma cepa com substituição de uma base no nucleotídeo 47 (Timina > Citosina) levando a alteração do aminoácido da posição 16 de Isoleucina para Treonina (Iso16Thr).

Estas substituições dos resíduos de aminoácidos nas posições 94 e 16 da enzima codificada pelo gene *inhA* podem resultar em diminuição da afinidade de ligação do co-fator NADH à enzima, tornando a cepa de *M. tuberculosis* resistente a INH. Mutações no sítio ativo da enzima que podem resultar em baixo nível de afinidade ao NADH de forma a não afetar a atividade enzimática de InhA resulta em resistência a INH e Etionamida (ETH) (DESSEN *et al.*, 1995; BARDOU *et al.*, 1998).

Segundo BASSO *et al.* (1998) e ROZWARSKI *et al.* (1998) a troca de aminoácidos no sítio de ligação do NADH na enzima InhA parece resultar em certo grau de resistência por impedir a ligação da INH ativada a enzima já ligada ao NADH. A INH somente se liga ao complexo InhA-NADH já formado resultando na inativação da enzima, seguida pela inibição da síntese de ácidos micólicos.

Em estudo semelhante com 42 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH, MORRIS *et al.* (1995) não encontraram alterações na região estrutural do gene *inhA*, porém 5 cepas apresentavam mutações na região regulatória do gene *inhA*. Dados concordantes foram obtidos por DESSEN *et al.* (1995) que detectaram alterações em nucleotídeos flanqueando um provável sítio de ligação ribossomal do operon *mabA - inhA*.

Desta forma conclui-se que a resistência a INH relacionada com o gene *inhA* pode ocorrer por mutações na região promotora de *inhA*, que situa-se a frente do operon *mabA-inhA*, e na região estrutural de *inhA*.

Mutações na região promotora do operon *mabA-inhA* pode levar a uma superexpressão de InhA, podendo então, causar resistência a INH por um mecanismo de titulação, elevando o alvo da droga para ação (HEYM *et al.*, 1999). Neste caso, mesmo que ocorra uma inativação parcial da enzima InhA pela INH, haverá níveis de atividade enzimática para que não interrompa ou altere a síntese de ácidos micólicos da parede celular micobacteriana. Esta alteração pode então resultar na regulação diferenciada da expressão de *inhA* induzindo resistência a INH. Entretanto, a extensão desta regulação pode variar consideravelmente com o sítio específico de mutação no operon *mabA-inhA* (MDLULI *et al.*, 1996).

Até o momento não foi encontrada nenhuma mutação no gene *mabA*, que codifica a enzima *Mycolic acid biosynthesis A*, que está localizado geneticamente acima do gene *inhA*, que possa ser responsabilizada em causar resistência a INH (BANERJEE *et al.*, 1998).

Em geral mutações em *inhA* estão associadas com baixos níveis de resistência a INH. Em contraste as mutações em *katG* podem causar baixo ou alto nível de resistência dependendo do efeito que cause na atividade da enzima (WILSON *et al.*, 1995; VAN SOOLINGEN *et al.*, 2000; ZHANG & TELENTI, 2000).

SHERMAN *et al.* (1996) demonstraram que cepas de *M. tuberculosis* com mutações no gene *katG* expressavam altos níveis de uma proteína de 22 kDa codificada pelo gene *ahpC* denominada de alquil-hidroperóxido redutase

(AhpC). Esta parece apresentar atividade análoga a outras peroxidases bacterianas, ou seja com atividade de combater peróxidos orgânicos.

Em outras bactérias como as pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, os genes *katG* e *ahpC* fazem parte de um regulon stress oxidativo denominado *oxyR* que é induzido em resposta a ação de peróxidos de hidrogênio e controla a expressão dos genes *katG* e *ahpC*. Nos membros do complexo *M. tuberculosis* o gene *oxyR* é inativo por apresentar múltiplas lesões genéticas, inclusive várias alterações de fase aberta de leitura e está situado a 105 pares de base do gene *ahpC* sendo ambos transcritos de forma divergente (DERETIC *et al.*, 1995; DERETIC *et al.*, 1997, RAMASWAMY & MUSSER, 1998).

Baseando-se em estudos genéticos com *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*, WILSON *et al.* (1995), DHANDAYUTHAPANI *et al.* (1996), WILSON & COLLINS (1996), HEYM *et al.* (1997) e WILSON *et al.* (1998) sugeriram que há um possível envolvimento da expressão aumentada da enzima AhpC na aquisição de resistência a INH. Porém, a presença de mutações na região regulatória do gene *ahpC*, situada na região intergênica *oxyR-ahpC*, em algumas cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH, podendo conferir elevada expressão da proteína AhpC, não parece ter relação direta com resistência a esse fármaco. A associação de mutações nessa região com resistência a INH parece ser mais complicada que a que ocorre com os genes *katG* e *inhA*. Sugere-se que mutações nessa região tenham ação compensatória conferindo certo grau de proteção ao microrganismo contra os peróxidos formados durante a ativação da INH, quando a atividade de peroxidase da enzima KatG está baixa ou ausente.

Em estudos realizados por KELLEY *et al.* (1997) e SREEVATSAN *et al.* (1997) analisando a região intergênica *oxyR-ahpC*, as seqüências dos genes *ahpC* e *oxyR* de isolados resistente e sensíveis a INH, foram encontrados alguns sítios polimórficos. Os autores relatam fato interessante de que cepas com mutações no códon 315 do gene *katG*, que diminui de forma significativa a atividade de catalase da enzima KatG e confere um valor de CIM

alto para INH (VAN SOOLINGEN *et al.*, 2000), não apresentam alterações em *ahpC* ou na região intergênica *oxyR-ahpC*.

As principais mutações encontradas na região intergênica *oxyR-ahpC* estão localizadas nas posições: -4, -6, -9, -10, -12, -30 -32, -39, -42, -44, -45, e -46 (KELLEY *et al.*, 1997 e SREEVATSAN *et al.*, 1997), em relação ao sítio de início da transcrição. O verdadeiro efeito de mutações nesta região na aquisição de resistência a INH por algumas cepas de *M. tuberculosis* não está totalmente esclarecida, pois os estudos realizados até o momento são todos com cepas resistentes geradas em laboratório ou com pequeno número de isolados clínicos, portanto estudos adicionais são necessários (HEYM *et al.*, 1997; KELLEY *et al.*, 1997; SREEVATSAN *et al.*, 1997; FANG *et al.*, 1999).

MDLULI *et al.* (1998a) mais recentemente, sugeriram a participação do gene *kasA*, que codifica a enzima β -cetoacetil ACP sintase (KasA) envolvida no processo de elongação da cadeia de ácidos micólicos, no mecanismo de resistência a INH e um provável efeito adicional de mutações em *katG* e *kasA* no valor da concentração inibitória mínima (CIM) para INH. Sugeriu-se a participação da enzima KasA no mecanismo de resistência a INH, uma vez que ocorre uma expressão aumentada de duas proteínas (12 kDa e de 80 kDa) quando da exposição do *M. tuberculosis* a baixas concentrações de INH (1 μ g/ml). Análise na seqüência de aminoácidos revelou que a proteína de 12 kDa apresenta homologia com a proteína ACP. Já a de 80 kDa provavelmente seja um complexo consistindo de ACP, INH e uma proteína com homologia com a β -cetoacetil ACP sintase (KasA).

Análise da seqüência nucleotídica do gene *kasA*, demonstrou que entre 28 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH, 4 continham mutações na seqüência codificadora de KasA (Asp66Asn, Gly269Ser, Gly312Ser e Phe413Leu), sendo que 2 das cepas não apresentavam alteração em outros genes de conhecido envolvimento com resistência a INH em *M. tuberculosis* MDLULI *et al.* (1998a).

Para LEE *et al.* (1999), mutações no gene *kasA* não parecem ser eventos freqüentemente associados com resistência a INH em *M. tuberculosis*.

Nesse estudo, analisando 160 cepas de *M. tuberculosis* resistente a INH em Singapura, foram identificados 4 diferentes sítios polimórficos (Arg121Lys, Gly269Ser, Gly312Ser e Gly387Asp) em 16 cepas resistentes e 1 sítio polimórfico (Gly312Ser) em 6 cepas sensíveis. O significado desse polimorfismo em *kasA* não está claro até o momento, necessitando melhores esclarecimentos de sua real importância na resistência a INH.

Mutações em *katG* e *inhA* não ocorrem em todas as cepas com resistência a INH, sendo encontradas em aproximadamente 60 a 80 % dos casos. Portanto, outros mecanismos podem resultar em resistência a INH que ainda não estão completamente esclarecidos. Desta forma, existem evidências que alterações em mais que dois genes contribuem como determinantes de resistência a INH, pois há relatos de cepas resistentes sem nenhuma aparente mutação nos genes *katG* e *inhA*. Em adição, mesmo quando existem mutações em *inhA* e *katG*, o nível de resistência, detectado pela CIM, indicam que nem sempre se correlacionam com mutações conhecidas (PRETORIUS *et al.*, 1995; MUSSER *et al.*, 1996).

Um pequeno número de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH não apresentam mutações em nenhum dos genes relacionados com resistência, indicando que um mecanismo ainda não definido até o momento, possa estar induzindo resistência nessas cepas. Neste sentido diversos genes estão sendo estudados na tentativa de achar o mecanismo responsável pela resistência dessas cepas.

CHEN & BISHAI (1998) e MIESEL *et al.* (1998) sugerem o envolvimento do gene *ndh* que codifica a enzima NADH desidrogenase (Ndh) da cadeia respiratória, na resistência a INH e co-resistência a ETH em cepas de *M. smegmatis*. Estes estudos sugerem que a presença de mutações neste gene gere defeitos de oxidação do NADH e conseqüentemente acúmulo de NADH e depleção de NAD⁺. Existem suposições de que a alteração da proporção NADH/NAD⁺ previna as reações de peroxidação que são requeridas para ativação da INH, bem como o deslocamento do complexo NADH-ácido isonicotínico da enzima InhA.

No sentido de analisar a contribuição do gene *ndh* no mecanismo de resistência a INH, LEE *et al.* (2001) seqüenciaram o gene *ndh* inteiro em 84 isolados de *M. tuberculosis* resistentes e 22 sensíveis a INH. Neste estudo foram detectados mutações em 8 isolados resistentes em 2 sítios polimórficos diferentes (Thr110Ala e Arg268His) e nenhuma mutação nas cepas sensíveis. Seus dados levaram a concluir que mutações no gene *ndh* parecem ser um mecanismo molecular adicional para aquisição de resistência a INH.

Os dados obtidos até o presente momento, tornam expressivo o fato de que, a análise do número de regiões gênicas associadas com resistência a INH não pode ser feita de forma universal. Os resultados discrepantes entre os diversos estudos provavelmente refletem diferenças de genótipos de *M. tuberculosis* geograficamente específicos.

O que se conclui até o momento é que diferenças geográficas na freqüência de mutações específicas associadas com resistência a INH são aparentes, necessitando, portanto de um estudo mais acurado para confirmação (MARTTILA *et al.*, 1996).

Segundo HIRATA *et al.* (1997) para o entendimento da disseminação de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes, é importante determinar as diferentes mutações que podem gerar fenômenos diferenciados de resistência às drogas e seus efeitos na virulência e patogenicidade das bactérias. Diferentes rotas de desenvolvimento da resistência a INH, tais como as mutações nos genes *KatG* e *inhA*, ou outros, poderiam ter conseqüências distintas em relação aos seus efeitos na fisiopatologia e na virulência das cepas resistentes resultantes.

A aplicação destes conhecimentos facilitará o desenvolvimento de métodos rápidos que permitam, por intermédio de técnicas moleculares, evidenciar genes responsáveis pela resistência das micobactérias presentes nos espécimes clínicos. Este é sem dúvida, um dos objetivos perseguidos com grande expectativa pelos micobacteriologistas, pois seria uma alternativa para as provas convencionais de sensibilidade micobacteriana a fármacos, que fornecem resultados tardiamente.

2. OBJETIVOS

GERAL

Caracterizar as mutações nos genes relacionados com resistência a INH, pelas técnicas de PCR-SSCP e de seqüenciamento, em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* do Brasil.

ESPECÍFICOS

- Otimizar a técnica de PCR-SSCP para triagem de mutações em genes relacionados com resistência a INH nos isolados clínicos de *M. tuberculosis*.
- Detectar e caracterizar mutações nos genes *katG*, *kasA*, *inhA* (regiões promotora e estrutural) e região intergênica *oxyR-ahpC* por seqüenciamento nos isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH.
- Determinar a frequência de mutações específicas nos genes *katG*, *kasA*, *inhA* (regiões promotora e estrutural) e região intergênica *oxyR-ahpC* nos isolados clínicos de *M. tuberculosis*.
- Estudar a relação das mutações encontradas nos genes *katG*, *kasA*, *inhA* (regiões promotora e estrutural) e região intergênica *oxyR-ahpC* com a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para INH nos isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH.

- Relacionar a eficiência da técnica de PCR-SSCP otimizada com a técnica de seqüenciamento para detectar mutações em isolados clínicos de *M. tuberculosis*.
- Estudar a relação da presença de mutações no gene *kasA* com a resistência a INH nos isolados clínicos de *M.tuberculosis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

Os isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes a INH utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de Sorocaba e do IAL de Ribeirão Preto, pelo Laboratório de Micobactérias do Instituto Clemente Ferreira – São Paulo e pelo Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Foram analisados 97 isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH e outros fármacos, bem como 60 isolados sensíveis a INH (Anexo A, B, C e D). Todos os isolados foram identificados bioquimicamente nos laboratórios de origem como sendo *M. tuberculosis* (KENT & KUBICA, 1985).

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado pelo método das proporções utilizando meio a base de ovo Lowenstein-Jensen (BBL), e incubado em estufa a 35°C durante 30 dias (CANETTI, RIST & GROSSET, 1963). A concentração crítica empregada para INH foi de 0,2 µg/mL e a proporção crítica para cepas resistentes de 1% (BRASIL, Ministério da Saúde, 1984).

Cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv, foi utilizada como controle das avaliações realizadas.

3.1.1 Condições de cultivo

Todos os isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes a INH, quando recebidos, foram cultivados em meio L-J (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA), preparado na seção de preparo de meios de cultura do Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP), a temperatura de 35°C durante 30 a 60 dias.

Os isolados clínicos foram estocados, na micobacterioteca do Laboratório de Microbiologia Clínica da FCF da USP, em L-J a 4 - 8°C e também em Middlebrook 7H9 (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA) com 20% de glicerol a -20°C para futuros teste microbiológicos e de Biologia Molecular.

3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica em microplaca utilizando Alamar Blue como agente revelador (MABA)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH foi realizada pelo método Microplate Alamar Blue Assay (MABA) utilizando o Alamar Blue (Alamar Biosciences/Acumed, Westlake, Ohio, USA) que é um indicador de óxido-redução a base de resazurina, como agente revelador de crescimento micobacteriano (COLLINS & FRANZBLAU, 1997; FRANZBLAU *et al.*, 1998).

3.2.1 Preparo das suspensões bacterianas

As suspensões bacterianas foram preparadas dispensando-se 1 alçada do crescimento em L-J, dos 97 isolados de *M. tuberculosis* resistentes, três sensíveis a INH e do controle sensível *M. Tuberculosis* H37Rv, em tubos de vidro 16 X 150 mm, com tampa de rosca, contendo pérolas de vidro estéreis e 2 ml de meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA).

As suspensões bacterianas, assim preparadas, foram suavemente agitadas em vortex para homogeneização do inóculo, e incubadas em estufa de 35 - 37°C durante 8 a 10 dias.

Após esse período de incubação, foi feita a comparação visual da turvação (crescimento bacteriano) com a escala de McFarland nº 1 (aproximadamente 10^8 microrganismos por mL). Quando o crescimento bacteriano apresentou maior turvação que a escala de McFarland nº1 as culturas foram diluídas utilizando-se Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA). Quando o crescimento bacteriano apresentou uma turvação menor, quando comparada com a escala de McFarland nº 1 foram realizados repiques em novo meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA). Desta forma, o cultivo bacteriano utilizado para a determinação da CIM apresentou cultura bacteriana em fase logarítmica de crescimento.

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

3.2.2 Preparo das soluções de INH

Soluções estoques de INH (10.000 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram preparadas em água deionizada estéril 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 $\mu\text{g/mL}$ (0,5 mL da “solução estoque 1” + 4,5 mL de Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA), sendo denominada **“Solução estoque 2”**. A partir da **“Solução estoque 2”** foi preparada a solução de trabalho de INH a uma

concentração de 128 µg/mL em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA).

As concentrações de INH para realização da CIM foram estabelecidas de acordo com FERRAZOLI *et al.* (1995) em 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg/mL.

Durante a otimização do teste MABA foi realizado a diluição 0,2 µg/mL em vez de 0,25 µg/mL para determinação da CIM para a cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Para isso foi preparado a parte uma solução de INH 0,8 µg/mL para ser adicionada a concavidade número 9.

3.2.3 Esquema das microplacas utilizadas para realização da CIM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
B	⊕	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	M	⊕
C	⊕	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	M	⊕
D	⊕	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	M	⊕
E	⊕	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	M	⊕
F	⊕	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	M	⊕
G	⊕	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	MDB	M	⊕
H	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

100 μ L de 7H9 suplementado com OADC (BBL) + 100 μ L da suspensão bacteriana padronizada e diluída 1:25 (CONTROLE DE CRESCIMENTO DA BACTÉRIA)

200 μ L de 7H9 suplementado com OADC (BBL) (CONTROLE DE ESTERILIDADE DO MEIO DE CULTIVO)

100 μ L de 7H9 suplementado com OADC (BBL) + 100 μ L solução de INH 128 μ g/mL na concavidade 2 e diluição seriada na razão 2 nos orifícios seguintes, com descarte de 100 μ L do último orifício (concavidade 9) (TESTES – DILUIÇÃO DE 32 A 0,25 μ g/mL)

⊕ 200 μ L de água deionizada estéril foi adicionada a todos os orifícios mais externos das microplacas (Falcon 3072: Becton Dickinson, Lincoln Park, USA) para minimizar a evaporação do meio de cultura durante a incubação.

3.2.4 Preparo da solução reveladora de Alamar Blue

Inicialmente uma solução de Tween 80 (Sigma St. Louis, MO, USA) a 10% foi preparada em água deionizada estéril. A solução de Alamar Blue utilizada para a revelação dos testes foi preparada diluindo-se a solução de Alamar Blue 10X (Alamar Biosciences/Acumed, Westlake, Ohio) com a solução de Tween 80 a 10%, na proporção 1:1. Esta solução foi preparada no momento da revelação das CIMs.

3.2.5 Realização dos testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para INH

Após ter sido realizada a diluição da INH nas microplacas, adicionou-se 100 μ L das suspensões de micobactérias padronizadas com escala de MacFarland nº 1 e diluídas a 1:25 nos orifícios de número 2 a 10 (Esquema).

A cada coluna, de B a G foram adicionadas diferentes isolados de *M. tuberculosis* estudados. As microplacas foram fechadas com suas tampas, seladas com fita adesiva transparente e incubadas a 35°C por 8 dias.

3.2.6 Leitura dos resultados da CIM

No nono dia de incubação, os controles de crescimento bacterianos e de esterilidade do meio de cultivo foram revelados pela adição de 25 μ L da solução de Alamar Blue (Alamar Biosciences/Acumed, Westlake, Ohio, USA) e de Tween 80 (Sigma, St Louis, MO, USA) a 10%, na proporção 1:1 recém preparada. As placas foram fechadas e seladas novamente com fita adesiva e incubadas por mais 24 horas a 35°C. Após este período, foram realizadas as

leituras dos controles de crescimento bacteriano e de esterilidade do meio de cultivo. Quando os controles apresentavam resultados de crescimento positivo no controle de cultivo bacteriano (cor rosa) e negativo no controle de esterilidade do meio de cultivo (cor azul), os testes foram revelados pela adição de nova mistura recém preparada de Alamar Blue (Biosciences/Acumed, Westlake, Ohio, USA) e de Tween 80 (Sigma St. Louis, MO, USA) e lidos após incubação de 24 horas a 35°C (FRANZBLAU *et al.*, 1998).

Quando os controles apresentaram alteração de crescimento micobacteriano ou de contaminação por outras bactérias ou fungos, os testes foram descartados e realizados novamente. Em todos os testes, a cepa padrão H37Rv, foi utilizada como controle.

A CIM foi definida como a menor concentração de INH capaz de impedir a mudança de cor azul para rosa utilizando leitura visual das microplacas (SATO, 1998).

3.3 Caracterização Molecular dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis*

Para a caracterização molecular de todos os 157 isolados de *M. tuberculosis* (97 resistentes e 60 sensíveis a INH) empregou-se a técnica de "Spoligotyping" (KAMERBEEK *et al.*, 1997; MOLHUIZEM *et al.*, 2000; SOINI *et al.*, 2000).

3.3.1 Extração do DNA genômico

Os DNAs genômicos micobacterianos foram extraídos utilizando-se a técnica descrita por GONZALEZ-MERCHAND *et al.* (1996) com introdução de algumas modificações. Resumidamente, uma alçada de cada cultivo bacteriano recente, em L-J, foi transferida para criotubos (Sigma St. Louis, MO, USA) contendo 200 µL de solução de lise Cloridrato de Guanidina 6M (Sigma St

Louis, MO, USA). Estes criotubos foram colocados em nitrogênio líquido por 5 minutos e, em seguida, em banho de água a 65°C por 10 minutos. Este procedimento de choque térmico foi repetido por mais uma vez. A seguir, para purificação do DNA, foram extraídas as proteínas, inicialmente com uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1, seguida por duas extrações com clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1. Os sobrenadantes contendo os DNAs foram precipitados com etanol absoluto, lavados com etanol 70% e secos em Centrífuga concentradora à vácuo modelo 5301 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e reconstituído em tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8,0).

3.3.2 Avaliação eletroforética do DNA genômico

A integridade das amostras de DNAs foi avaliada em gel de agarose (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) a 1,5% em tampão TBE (Tris-HCl 90mM, ácido bórico 90mM e EDTA 2mM) em cuba eletroforética (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Rockville, MD USA) (SAMBROOK *et al.*, 1989a). O gel foi imerso em tampão TBE (Tris-HCl 90mM, ácido bórico 90mM e EDTA 2mM) e as amostras contendo 5 µL do DNA e 1 µL do tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 30%) foram aplicadas no gel de agarose. Aplicou-se também 5 µL de marcador de tamanho molecular de DNA de 1 Kb diluído na proporção de 1:6 e, tampão de amostra. A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 1 hora, utilizando fonte modelo EPS 200 (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Suécia).

Após a eletroforese, as bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador modelo Macrovue (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Suécia), sob luz UV, após coloração do gel com solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL, durante 15 minutos e lavados em água destilada. Os resultados foram documentados com o sistema fotográfico Polaróide modelo DS 34 (Cambridge, USA).

3.3.3 Quantificação e análise de pureza do DNA genômico

A quantificação e análise de pureza (relação A260/A280) das amostras de DNAs extraídas foram realizadas por espectrofotometria em UV (Beckman DU 640, Fullerton, CA, USA) após diluição (1:10) das amostras em tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8,0) (SAMBROOK *et al.*, 1989b). Os DNAs, assim obtidos, foram armazenados à temperatura de - 20°C para uso posterior.

3.3.4 Seqüências de oligonucleotídeos específicos da região espaçadora do locus DR

Todos os 43 oligonucleotídeos foram selecionados a partir da seqüência do locus DR de cepas de *M. tuberculosis* H37Rv e de *M. bovis* BCG e manufaturados no setor de síntese de oligonucleotídeos (Biotechnology) do CDC com um grupo amino na posição terminal 5' pelo qual estes foram covalentemente ligados a membrana Biodyne C (Pall biosupport, Portsmouth, UK) ativada com carga negativa (Anexo C).

3.3.5 Preparação da membrana contendo os oligonucleotídeos espaçadores para realização da técnica de “Spoligotyping”

Inicialmente a membrana de Biodyne C (Pall biosupport, Portsmouth, UK) foi ativada por imersão em 10 mL de 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide - EDCA 16% (Sigma, St Louis, MO, USA) recentemente preparada, a temperatura ambiente em frasco de hibridação durante 5 minutos. Após lavada com água deionizada, a membrana foi colocada no sistema Minibloter com 45 canaletas MN 45 (Immunetics, Cambridge, MA, USA) para fixação dos oligonucleotídeos. A primeira e última canaletas foram preenchidas com tinta de caneta diluída em SSPE 2X (Gibco-BRL Life Technologies Inc.,

Rockville, MD, USA). As outras 43 canaletas foram preenchidas com 150 μ L de cada um dos 43 diferentes oligonucleotídeos previamente diluídos (Anexo E) e incubados, durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, os oligonucleotídeos foram removidos por aspiração e a membrana imersa em solução de NaOH 100 mM (Gibco-BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA) por no máximo 10 minutos. A membrana foi então lavada em água deionizada e após, em solução de SSPE 2X (Gibco – BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA) com 0,1% de SDS (Gibco – BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD) por 5 min a 60°C. A seguir a membrana foi lavada em solução de EDTA (Gibco – BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD) 20 mM pH 8,0 por 15 minutos a temperatura ambiente e estocada em saco plástico a 4°C até o momento do uso.

3.3.6 Iniciadores utilizados para amplificação do locus DR

Os iniciadores foram selecionados a partir da seqüência genômica do locus DR de *M. tuberculosis* e manufaturados no setor de síntese de oligonucleotídeos (Biotechnology) no CDC de acordo com MOLHUIZEM *et al.* (2000).

3.3.7 Amplificação do locus DR

Foi realizada a amplificação do locus DR de 157 isolados de *M. tuberculosis*, empregando metodologia descrita por MOLHUIZEM *et al.*, (2000) e padronizada no Laboratório de Tuberculose (NCID-DAST-TB/Mycobacteriology) do CDC.

A PCR foi realizada adicionando 1 μ L de DNA micobacteriano a uma mistura de 12,5 μ L de Hot Start TaqTM Master Mix (Qiagen Inc. Valencia, CA USA), 2 μ L de cada iniciador na concentração de 5 μ M e 7,5 μ L de água

deionizada estéril (Tabela 1). O Master Mix contém Taq DNA Polymerase, tampão de PCR, $MgCl_2$ e dNTPs. Após o preparo, a solução apresentou uma concentração final de 1,5 mM de $MgCl_2$ e 200 μM de cada dNTP. Foi então realizada a amplificação em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) programado da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 15 min; amplificação: 20 ciclos de 95°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 1 minuto (hibridação) e 72°C por 30 segundos (extensão); extensão final: 72°C por 10 minutos. Ao final dos ciclos a reação foi interrompida por resfriamento a 4°C.

Tabela 1. Concentração de reagentes empregados na amplificação do locus DR para realização de “Spoligotyping”.

REAGENTES	VOLUME POR REAÇÃO (μl)
Hot Start Taq Máster Mix (Qiagen)	12,5
Iniciador DRa* (5 μM)	2,0
Iniciador DRb (5 μM)	2,0
Água deionizada estéril	7,5
DNA micobacteriano	1,0
Vol. Total da reação	25,0

* Iniciador biotinilado na terminação 5'

3.3.8 Hibridação com produto da PCR

A membrana foi adaptada no minibloter MN 45 (Immunitics Cambridge, MA, USA), após prévia lavagem em solução aquecida a 42°C de SSPE 2X (Gibco – BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA) de forma

que os oligonucleotídeos fixados ficassem em orientação perpendicular às canaletas onde foram aplicados os produtos da PCR. Para a realização da hibridação, os produtos da PCR foram desnaturação com 150 μ L de SSPE 2X (Gibco – BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA) contendo 0,1% de SDS (Gibco – BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA) durante 10 minutos a 100°C e imersos imediatamente em gelo. Em seguida, 150 μ L de cada produto de PCR desnaturado foram colocados para hibridar com os oligonucleotídeos durante 60 minutos a 60°C em superfície horizontal sem agitação. Na sequência, a membrana foi lavada duas vezes com solução pré-aquecida de SSPE 2X contendo 0,5% de SDS (Gibco – BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA) durante 10 minutos a 60°C.

A membrana foi colocada a 42°C durante 60 minutos em tubos de hibridação contendo 10 ml de SSPE 2X com 0,5% de SDS (Gibco – BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA) e 3 μ l do conjugado Streptavidina-peroxidase 500 U/mL (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Alemanha).

Novamente duas lavagens foram realizadas utilizando SSPE 2X com 0,5% SDS (Gibco – BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA) durante 10 minutos a 42°C e outras 2 lavagens durante 5 minutos cada, a temperatura ambiente com SSPE 2X (Gibco – BRL Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA) foram realizados.

Para detecção por quimiluminescência da hibridação do DNA, a membrana foi incubada por 1 minuto em líquido de detecção de quimiluminescência ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK), envolta em filme plástico e exposta em Filme Kodak X-Omat AR (Eastman Kodak Company) durante 20 minutos. O filme foi revelado em Sistema semi-automático (Eastman Kodak Company).

3.3.9 Leitura e comparação dos perfis de “Spoligotyping”

A leitura dos perfis de “spoligotyping” foram realizados utilizando-se sistema de comparação (GROENEN *et al.*, 1993) adotado no laboratório de tuberculose (NCID-DAST-TB/Mycobacteriology Branch) do CDC. Neste sistema definiu-se um número para cada hibridação que compunham um grupo de 3 hibridações, sendo esses números 4, 2, 1. Para a ausência de hibridação foi atribuída o numeral zero.

Os perfis de hibridação obtidos com os isolados de *M. tuberculosis* foram comparados com os perfis dos controles de *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG. Todos os testes foram realizados com um controle negativo da reação de PCR.

3.4 Triagem de mutações em genes relacionados com resistência a INH pela técnica de PCR–SSCP

3.4.1 Amplificação dos genes por reação em cadeia pela polimerase (PCR) para realização da técnica de triagem de mutações

O gene *kasA*, as regiões adjacentes aos codons 315 e 463 do gene *katG*, a região promotora e as regiões adjacentes aos codons 16 e 94 do gene *inhA*, e a região intergênica *oxyR-ahpC* foram amplificadas por PCR em termociclador Gene Amp System 2400 (Perkin-Elmer, Corp. Foster City, Calif., USA). Os iniciadores foram escolhidos de modo a obter produtos de amplificação de comprimento aproximado de 250 pares de base (Figuras 1, 2, 3 e 4).

Para análise do gene *kasA* foram construídos 6 pares de iniciadores para obtenção de produto de amplificação com sobreposição na terminações 5' e 3' do fragmento de DNA, com o objetivo de analisar o gene em toda a sua extensão. Com o objetivo de estabelecer as concentrações ideais dos reagentes e as condições ideais dos ciclos de amplificação para as amostras,

foram realizadas testes inicialmente baseados nos trabalhos de COOKSEY *et al.* (1996b); NOLLAU & WAGENER, 1997; WELSH *et al.* (1997); FANG *et al.* (1999); PINHEIRO *et al.* (1999) e padronizados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP.

3.4.2. Iniciadores

As seqüências de oligonucleotídeos iniciadores usadas para amplificar regiões específicas dos genes *KatG*, *kasA*, *inhA* (regiões promotora e estrutural) e região intergênica *oxyR-ahpC*, com a finalidade de triagem de mutações por PCR-SSCP foram selecionadas de acordo com informações disponíveis no GenBank e os trabalhos realizados por FANG *et al.* (1999).

Para o gene *katG* foram selecionados 2 pares de iniciadores com objetivo de amplificar pela PCR as regiões gênicas que incluem os códons 315 e 463 (Figura 1). Para o gene *inhA* foram selecionados 3 pares de iniciadores (Figura 2). Um par de iniciadores para amplificar a região promotora do gene *inhA*, que está localizado geneticamente a frente do gene *mabA*, e 2 pares para amplificar as regiões adjacentes aos codons 16 e 94 do gene *inhA*.

A região promotora do gene *ahpC* foi amplificada utilizando iniciadores para amplificar a região intergênica *oxyR-ahpC* composta de 105 pares de bases (Figura 4).

Para a triagem de mutações por PCR-SSCP do gene *kasA* em toda a sua extensão, foram selecionados 6 pares de iniciadores (Figura 3) de forma a obter 6 fragmentos de DNA com sobreposição das regiões 5' e 3'.

O número de acesso ao GenBank, tamanho do produto da PCR e a localização dos iniciadores empregados nas reações de PCR estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores usados na PCR para realização da SSCP para detectar mutação nos genes *katG*, *inhA* (regiões promotora e estrutural), *kasA* e região intergênica *oxyR-ahpC*.

Nº de acesso	Nome	Comp. (pb)	Localização	Fragmento
Z97193	katG 315F	20	32059 - 32078	145 bp
	katG 315R	20	31915 - 31934	
Z97193	katG 463F	20	31636 - 31655	162 bp
	katG 463R	20	31494 - 31513	
V66801	inhA 1F	21	909 - 929	187 bp
	inhA 1R	21	1075 - 1095	
V02492	inhA 16F	20	1779 - 1798	222 bp
	inhA 16R	20	1981 - 2000	
AF106077	inhA 94F	21	1994 - 2014	182 bp
	inhA 94R	21	2156 - 2176	
V16243	ahpC F	21	7147 - 7167	264 bp
	ahpC R	21	7390 - 7410	
Z70692	KasA 1F	20	30631 - 30650	262 bp
	KasA 1R	20	30873 - 30892	
	KasA 2F	20	30844 - 30863	267 bp
	KasA 2R	20	31092 - 31111	
	KasA 3F	20	31066 - 31085	269 bp
	KasA 3R	20	31314 - 31333	
	KasA 4F	20	31290 - 31309	263 bp
	KasA 4R	20	31533 - 31552	
	KasA 5F	20	31507 - 31526	223 bp
	KasA 5R	20	31710 - 31729	
	KasA 6F	20	31682 - 31701	255 bp
	KasA 6R	20	31917 - 31936	

GIBCO BRL Custom primers - LIFE TECHNOLOGIES

Figura 1. Esquema representativo das regiões em que os iniciadores se localizam para amplificação das regiões adjacentes aos codons 315 e 463 do gene *katG*, pela PCR com finalidade de triagem de mutações por SSCP.

Figura 2. Esquema representativo das regiões em que os iniciadores se localizam para amplificação dos fragmentos do gene de *inhA* pela PCR com a finalidade de triagem de mutação por SSCP.

Figura 3. Esquema representativo das regiões em que os iniciadores se localizam para amplificação dos fragmentos do gene *KasA* pela PCR com a finalidade de triagem de mutação por SSCP em toda extensão do gene.

Figura 4. Esquema representativo das regiões em que os iniciadores se localizam para amplificação do fragmento inter gene *ahpC* e *oxyR* pela PCR com a finalidade de triagem de mutação por SSCP.

3.4.3 Otimização da PCR

A amplificação das regiões adjacentes aos codons 315 e 463 do gene *katG*, regiões promotoras e adjacentes aos codons 16 e 94 do gene *inhA*, região intergênica *oxyR-ahpC* e do gene *kasA* foi realizada usando o seguinte protocolo: Em microtubos para PCR, de 0,2 mL pipetou-se 1 µL de DNA genômico, tampão de PCR 1X (Tris-HCl a 75mM pH 9,0; KCl a 50 mM; MgCl₂ a 2,0 mM), 0,2 mM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP) (Pharmacia Biosciences do Brasil Ltda), 100 nM de cada iniciador, 1 U de enzima DNA polimerase (Biotools) e água deionizada esterilizada para volume final de 50 µL.

As regiões gênicas de interesse nesse estudo foram amplificadas em termociclador Gene Amp System 2400 (Perkin-Elmer, Corp. Foster City, Calif., USA) utilizando-se programas específicos otimizados no Laboratório de Biologia Molecular da FCF da USP, para cada pares de iniciadores (Tabela 3 a 8).

Tabela 3. Programas utilizados para amplificar as regiões gênicas adjacentes aos códons 315 e 463 do gene *katG*, região promotora e regiões gênicas adjacentes aos códons 16 e 94 do gene *inhA*, região intergênica *oxyR-ahpC* e o gene *kasA* em toda a sua extensão em seis fragmentos de DNA.

Iniciadores	Desnaturação	30 ciclos	Extensão Final
katG 315F katG 315R	94°C/5min	94°C/1min, 58°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min
katG 463F katG 463R	94°C/5min	94°C/1min, 60°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min
inhA 1F inhA 1R	94°C/5min	94°C/1min, 60°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min
inhA 16F inhA 16R	94°C/5min	94°C/1min, 52°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min
inhA 94F inhA 94R	94°C/5min	94°C/1min, 63°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min
ahpC F ahpC R	94°C/5min	94°C/1min, 60°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min
kasA 1F kasA 1R	94°C/5min	94°C/1min, 68°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min
kasA 2F kasA 2R	94°C/5min	94°C/1min, 58°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min
kasA 3F kasA 3R	94°C/5min	94°C/1min, 63°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min
kasA 4F kasA 4R	94°C/5min	94°C/1min, 68°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min
kasA 5F kasA 5R	94°C/5min	94°C/1min, 63°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min
kasA 6F kasA 6R	94°C/5min	94°C/1min, 63°C/1min, 72°C/1min	72°C/10min

3.4.4 Avaliação dos produtos de amplificação para realização da técnica de SSCP

Todos os produtos das reações de amplificação foram avaliados quanto à especificidade da reação, em gel de agarose 1,5%. O gel foi preparado com agarose (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) em tampão TBE (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM pH 8,0), aquecido em forno microondas durante trinta segundos. Cinco μ L de cada produto de amplificação misturados a 1 μ L de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xilenicianol FF 0,25% e glicerol 30%) foram submetidos à separação eletroforética por 1 hora a 100 Volts em sistema eletroforético Horizon 11-14 (Gibco- BRL Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, USA) e fonte PAC 1000 (Bio-Rad Lab., Inc.Hercules, CA USA). Foram utilizados 5 μ L de marcador de DNA, de 100 pares de base (pb) (Amersham Biosciences do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) diluído em tampão de amostra, na proporção 1:6 como padrão de tamanho molecular.

Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 μ g/mL durante 15 minutos, lavados em H₂O destilada e os fragmentos de DNA foram visibilizados sob luz UV e fotografados com sistema de fotodocumentação Alphamager 2000 Documentation & Analysis System (AlphaInnotech Corporation).

Os produtos da PCR das diferentes regiões gênicas estudadas foram armazenados a – 20°C até a análise por SSCP.

3.4.5 Controle de qualidade das PCRs

Todas as amplificações realizadas pela técnica de PCR, usaram como controle interno um branco de reação. Esse controle negativo consistiu de um tubo onde foram adicionados todos reagentes para a reação de amplificação, com exceção da amostra de DNA.

Foi também utilizado um controle positivo empregando-se DNA extraído da cepa padrão *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, gentilmente cedida pelo Laboratório de Micobactérias do Centro de Referência Prof. Hélio Fraga – Rio de Janeiro.

3.4.6 Triagem de mutações por Análise do Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP)

As triagens de alterações nos genes relacionados com resistência a INH foram realizadas pela técnica de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP) (TELENTI *et al.*, 1998). Uma vez determinada a presença de um único fragmento de DNA, por eletroforese em gel de agarose 1,5%, 1 µL dos produtos das PCRs foram desnaturados em 25 µL de tampão de desnaturação (formamida 95%, EDTA 20mM, xilenocianol 0,005% e azul de bromofenol 0,005%) a uma temperatura de 94°C por 5 minutos e imersos imediatamente em gelo. A seguir, 5 µL dos produtos desnaturados foram submetidos à separação eletroforética no Sistema GenePhor™, utilizando GeneGel Excel 12.5/24 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)

3.4.7 Otimização das condições de SSCP

As condições de realização de SSCP para cada região analisada foram otimizadas no laboratório de Biologia Molecular da FCF da USP, baseando-se nos trabalhos de COOKSEY *et al.* (1996b) e FANG *et al.* (1999).

Para adequação das condições de eletroforese foram realizados vários testes. Foram realizados SSCPs nas temperaturas: 5°C, 8°C, 12°C, 13°C e 15°C utilizando as potências que variaram de 300, 350, 400, 500 e 600 Volts.

O tempo de realização de eletroforese variou de 1 hora e 30 minutos a 3 horas sendo inversamente proporcional a potência utilizada.

3.4.8 Colorações dos géis de poliacrilamida

A coloração dos géis de poliacrilamida foi realizada em um sistema semi-automático, Processor Plus (Amersham Biosciences, uppsala, Suécia) cuja etapa se resume a seguir: inicialmente os géis foram fixados com solução contendo ácido acético 0,5% e etanol 10% durante 30 minutos, sob agitação, em seguida foram impregnados com solução de prata 0,17% durante 15 minutos, sob agitação. Os géis foram lavados com água destilada para retirar o excesso da prata e as bandas de DNAs foram então precipitadas com formaldeído 37% em solução de NaOH durante 15 minutos sob agitação, para visibilização dos perfis eletroforéticos de SSCP (PORRO *et al.*, 1982).

Os géis foram fotografados em sistema de fotodocumentação Alpha Imager 2000 – Documentation & Analysis System (AlphaInnotech-Corporation) e imortalizados, após lavagem com água destilada e 10% de glicerina (Merck), e deixados secar em temperatura ambiente por 48 horas entre folhas de papel celofane.

3.5 Detecção de mutações nos genes *katG*, *kasA*, *inhA* (regiões estrutural e promotora) e região intergênica *oxyR-ahpC* por seqüenciamento semi-automático.

Os isolados de *M. tuberculosis* que apresentaram genes com perfis de SSCP diferentes do perfil da cepa controle H37Rv, foram submetidos ao seqüenciamento semi-automático de produto de PCR, utilizando o seqüenciador ABI PRISM modelo 373XL (P E Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no Laboratório de tuberculose (NCID-DAST-TB/Mycobacteriology) do CDC-Atlanta, USA.

3.5.1 Iniciadores

Os oligonucleotídeos utilizados na reação de seqüenciamento foram selecionados de forma a obter fragmentos de DNA maiores que os obtidos pelos iniciadores utilizados para a triagem de mutações pela PCR-SSCP (Tabela 4, 5 e 6).

Para seqüenciar o gene *katG* em toda a sua extensão foram selecionados 14 iniciadores (Tabela 4). A estratégia descrita na Tabela 10 foi adotada para a obtenção de 4 fragmentos de DNA pela PCR, que foram denominados PCR # 1, PCR # 2, PCR # 3 e PCR # 4. A partir destes 4 produtos da PCR realizou-se o seqüenciamento dos mesmos segundo metodologia descrita na Tabela 15.

Os números de acesso ao GenBank, o tamanho do produto da PCR e a localização dos iniciadores utilizados nas PCRs e nas reações de seqüenciamento das regiões gênicas de interesse, e alguns para seqüenciar o gene em toda a extensão como no caso do gene *katG*, estão listados nas tabelas 4, 5 e 6 e foram manufaturados no setor de síntese de oligonucleotídeos (Biotechnology) do CDC.

Tabela 4. Iniciadores usados para realização de PCR e seqüenciamento do gene *katG* em toda a sua extensão

Nome	Comprimento (pb)	Localização
KatG~1	21	1947 – 1967
KatG~2	18	2254 – 2271
<i>KatG~3</i>	18	2283 – 2300
KatG~4	16	2586 – 2601
<i>KatG~5</i>	21	2606 – 2626
KatG~6	19	2884 – 2902
<i>KatG~7</i>	21	2936 – 2956
KatG~8	20	3182 – 3201
<i>KatG~9</i>	21	3213 – 3233
KatG~10	20	3482 – 3501
<i>KatG~11</i>	21	3527 – 3547
KatG~12	21	3794 – 3814
<i>KatG~13</i>	21	3828 – 3848
<i>KatG~14</i>	17	4229 – 4245

Os iniciadores em negrito estão em direção sense em relação a seqüência presente no GenBank. Aqueles em itálico estão em orientação antisense. O numero da localização refere-se a posição do iniciador em relação a seqüência do gene *katG* depositado no GenBank (número de acesso X68081). A fase aberta de leitura do gene é de 2223 pares de base e inicia-se no nucleotídeo 1979 e termina no nucleotídeo 4201.

Tabela 5. Iniciadores usados para realização da PCR e seqüenciamento das regiões promotora e estrutural do gene *inhA*, região adjacente ao codon 315 do gene *katG* e região intergênica *oxyR-ahpC*.

Nº acesso.	Nome	Comprimento (pb)	Localização	Fragmento (pb)
U41314	BC 48	21	725 - 745	
U41314	BC 51R	20	1027 - 1046	322
Z79701	<i>inhA</i> -1	20	870 - 889	
Z79701	<i>inhA</i> -2	20	1098 - 117	248
Z79701	<i>inhA</i> -5	21	1813 - 1833	
Z79701	<i>inhA</i> -6	21	2158 - 2178	366
Z81451	<i>ahpC</i> -1	21	7455 - 7475	
Z81451	<i>ahpC</i> -2	21	7117 - 7137	359

Tabela 6. Iniciadores utilizados na PCR e seqüenciamento de toda extensão do gene *kasA*.

Nome	Comprimento	Localização
KasA-1	21	93 - 113
KasA-2	21	435 - 455
<i>KasA-3</i>	21	498 - 518
KasA-4	21	736 - 756
<i>KasA-5</i>	20	773 - 792
KasA-6	20	1024 - 1043
<i>KasA-7</i>	19	1045 - 1063
<i>KasA-8</i>	21	1418 - 1438

Os iniciadores em negrito estão em direção sense em relação a orientação da seqüência no GenBank. As seqüências em itálico estão em orientação antisense. O número de localização refere-se a posição do iniciador em relação as bases 30541 até 32161 do segmento 99/162 do genoma completo da cepa H37Rv (GenBank acesso nº Z70692). O gene apresenta tamanho de 1251 pares de base e começa em 123 e termina em 1373.

3.5.2 Otimização da PCR

As concentrações de reagentes (Tabela 7) e condições de realização da PCR (Tabela 8 e 9) para posterior seqüenciamento foram estabelecidas de acordo com recomendação do fabricante e adaptado no laboratório de tuberculose (NCID-DAST-TB/Mycobacteriology branch) do CDC.

As reações de amplificações foram realizadas em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems Corp. Foster City, CA, USA) usando Hot start TaqTM Master Mix Kit (1000 Units) (Qiagen Inc. Valencia, CA, USA).

Tabela 7. Concentrações dos reagentes usados para a realização da PCR utilizando Kit Hot Start Master Mix (Qiagen) para posterior seqüenciamento do produto da PCR.

REAGENTES	VOLUME POR REAÇÃO (μL)
Hot Start master Mix (Qiagen)	12,5
Iniciador sense (5 μM)	1,5
Iniciador antisense (5 μM)	1,5
Água deionizada estéril	8,5
DNA micobacteriano	1,0
Volume Total da reação	25,0

Tabela 8. Programa utilizado para amplificar a região adjacente ao codon 315 do gene *katG* utilizando os iniciadores BC 48 e BC 51R para posterior seqüenciamento do produto.

Desnaturação	95°C	15 min.
35 ciclos	95°C	30 seg
	58°C	30 seg
	72°C	30 seg
Extensão final	72°C	5 min

Tabela 9. Programa utilizado para amplificar a região promotora e regiões adjacentes aos codons 16 e 94 do gene *inhA* e região promotora de *ahpC* utilizando os iniciadores *inhA* 1 e *inhA* 2, *inhA* 5 e *inhA* 6 e *ahpC* 1 e *ahpC* 2 respectivamente.

Desnaturação	96°C	15 min.
35 ciclos	96°C	30 seg.
	60°C	30 seg.
	72°C	30 seg.
Extensão final	72°C	5 min.

Tabela 10. Estratégia estabelecida para realização da PCR para seqüenciamento do gene *katG* em toda a sua extensão.

PCR	Iniciadores	Tamanho do produto da PCR
PCR # 1	KatG ~ 1	680 pb
	KatG ~ 5	
PCR # 2	KatG ~ 4	648 pb
	KatG ~ 9	
PCR # 3	KatG ~ 8	667 pb
	KatG ~ 13	
PCR # 4	KatG ~ 12	452 pb
	KatG ~ 14	

Para realização das PCR # 1, PCR # 2 e PCR # 3 foi utilizado um único programa de amplificação descrito na Tabela 11.

Tabela 11. Programa utilizado para realizar as PCRs *katG* #1, *katG* #2 e *katG* #3 do gene *katG* utilizando os iniciadores *katG* ~ 1 e *katG* ~ 5, *katG* ~ 4 e *katG* ~ 9 e *katG* ~ 8 e *katG* ~ 13 respectivamente.

Desnaturação	95°C	15 min.
35 ciclos	95°C	30 seg.
	68°C	75 seg.
Extensão final	68°C	5 min.

Para a realização da PCR #4 foi utilizado o programa abaixo descrito na Tabela 12.

Tabela 12. Programa utilizado para realizar a PCR *katG* #4 do gene *katG* utilizando os iniciadores *katG* ~ 12 e *katG* ~ 14.

Desnaturação	95°C	15 min.
35 ciclos	95°C	30 seg.
	60°C	30 seg.
	72°C	30 seg.
Extensão final	72°C	5 min.

Para seqüenciar algumas das regiões do gene *kasA* que apresentaram perfis de SSCP diferente do apresentado pela cepa padrão H37Rv foi realizado PCR utilizando os iniciadores, protocolo e programa descritos nas Tabelas 6, 7 e 13 respectivamente.

Tabela 13. Programa utilizado para amplificar as regiões kasA 3, kasA 4 e kasA 5 utilizando os iniciadores kasA ~ 1 e kasA ~ 5, kaA ~ 4 e kasA ~ 8.

Desnaturação	95°C	15 min.
35 ciclos	95°C	30 seg.
	68°C	75 seg.
Extensão final	68°C	10 min.

3.5.3 Avaliação dos produtos de amplificação para realização de seqüenciamento semi-automático

Todos os produtos de amplificação foram avaliados quanto à especificidade da reação em gel de agarose 2,0%. O gel foi preparado com agarose (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) em tampão TBE (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM pH 8,0), aquecido em forno de microondas durante trinta segundos. Cinco μ L de cada produto de amplificação misturados a 1 μ L de tampão de aplicação (azul de bromofenol 0,25%, xilenicianol FF 0,25% e glicerol 30%) foram submetidos à separação eletroforética por 1 a 2 horas a 100 Volts em sistema eletroforético Horizon 11-14 (Gibco- BRL Rockville, MD, USA) e fonte PAC 1000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Foram utilizados 5 μ L de marcador de DNA, de 100 pares de base (pb) (Amersham-Biosciences, Uppsala, Suécia) diluído em tampão de amostra, na proporção 1:6 como padrão de tamanho molecular.

Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 μ g/mL durante 15 minutos, lavados em H₂O destilada e os fragmentos de DNA foram visibilizados sob luz UV e fotografados com sistema de fotodocumentação Alphamager 2000 Documentation & Analysis System (AlphaInnotech Corporation).

3.5.4 Reação de seqüenciamento semi-automático de produtos da PCR

As reações de seqüenciamento dos produtos das PCRs obtidos, foram realizadas utilizando kit comercial DNA sequencig Kit (Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing) com AmpliTaq^R DNA Polimerase (ABI PRISM Applied Biosystems) em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems Corp. Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fornecedor. As concentrações dos reagentes foram padronizadas no laboratório de tuberculose (NCID-DAST-TB/Mycobacteriology branch) do CDC e estão descritas na Tabela 14.

Os microtubos para PCR contendo os reagentes para a reação de seqüenciamento foram submetidos a 1 ciclo de desnaturação a 96°C durante 5 minutos, 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 4 segundos e 60°C por 4 minutos.

Cada produto da PCR foi seqüenciado em ambas direções, em dois ciclos de seqüenciamento separados. O seqüenciamento foi realizado com o iniciador sense para seqüenciar a fita sense e com o iniciador antisense para seqüenciar a fita antisense.

Para o seqüenciar o gene *katG* por inteiro uma estratégia descrita na Tabela 15 foi estabelecida e realizada a partir de 4 produtos da PCR (Tabela 10). Desta forma realizou-se sete reações de seqüenciamento (A até G) de forma a obter fragmentos com sobreposição nas regiões 5' e 3'.

Os isolados de *M. tuberculosis* com mutações na região *kasA* 3 e *kasA* 4 foram seqüenciados utilizando-se os iniciadores *kasA* ~ 2 e *kasA* ~ 5, e *kasA* ~ 4 e *kasA* ~ 7 respectivamente. Para os isolados com mutações na região *kasA* 5 foram realizados ciclos de seqüenciamentos com os iniciadores *kasA* ~ 4 e *kasA* ~ 7 e também com *kasA* ~ 6 e *kasA* ~ 8.

Para os ciclos de seqüenciamento do demais genes estudados foram utilizados os mesmos iniciadores empregados na PCR.

Tabela 14. Concentrações dos reagentes para a reação de seqüenciamento semi-automático de produto de PCR.

Reagentes	Volume por reação (μ L)
Oligonucleotídeo Iniciador (1 μ M)	3,2
Big Dye Terminator MIX (ABI Prism P E Applied Biosystem)	4,0
Tampão de seqüenciamento (5X) (ABI Prism P E Applied Biosystems)	2,0
Água deionizada estéril	9,8
Produto da PCR	1,0
Volume total da reação	19,0

Tabela 15. Estratégia usada para seqüenciamento do gene *katG* em toda sua extensão.

PCR	Seqüenciamento	Iniciadores	Produto	Tamanho do produto (pb)
PCR #1	Reação A	KatG ~ 1 e katG ~ 3	1968 – 2282	315
	Reação B	KatG ~ 2 e katG ~ 5	2272 - 2605	334
PCR # 2	Reação C	KatG ~ 4 e katG ~ 7	2602 – 2935	334
	Reação D	KatG ~ 6 e katG ~ 9	2903 - 3212	310
PCR # 3	Reação E	KatG ~ 8 e katG ~ 11	3202 – 3526	325
	Reação F	KatG ~ 10 e katG ~13	3502 - 3827	326
PCR # 4	Reação G	KatG ~ 12 e katG ~ 14	3815 - 4228	414

3.5.5 Purificação dos produtos dos ciclos de seqüenciamento

Os produtos obtidos pelo ciclo de seqüenciamento foram purificados para remoção de iniciadores e ddNTPs não incorporados durante a reação utilizando-se CENTRI-SEP colunas (Princeton Separations, Inc. Adelphia, NJ, USA). Inicialmente as colunas foram hidratadas com 800 μ l de água deionizada

estéril e deixadas em repouso por 1 hora e centrifugadas a 3000 rpm (Centrifuge 5415c Eppendorf, Hamburg, Alemanha) durante 2 minutos. Todo o produto do seqüenciamento foi transferido para as colunas e centrifugado novamente a 3000 rpm durante 2 minutos. O centrifugado foi então, recolhido em um tubo de microcentrifuga estéril e seco em centrífuga concentradora a vácuo (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) durante 45 minutos. Os produtos assim preparados, foram estocados em refrigerador até o momento da realização da eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.5.6 Realização de eletroforese dos produtos dos ciclos de seqüenciamento

A eletroforese dos produtos dos ciclos de seqüenciamento foi realizada em gel de poliacrilamida (Uréia 8,5 M, 50%; Acrilamida (19:1), 6%; em TBE (Tris 0,89 mM; ácido bórico 0,89 mM; EDTA 0,02 M).

A mistura do gel foi preparada em um béquer de 150 mL contendo agitador magnético onde dispensou-se 40g de uréia (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha), 12 mL de acrilamida-bisacrilamida 40% (19:1) (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA), 27 mL de água destilada e 1g de mistura de pérolas de resina de troca iônica AG^R 501-X8 resin (Bio-Rad laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). A dissolução foi realizada em agitador magnético com leve aquecimento, a seguir, a solução foi filtrada em membrana Millipore 0,2 µm. Ao filtrado, foi adicionado 8 mL de TBE (Gibco BRL Life Technologies Inc, Rockville, MD USA) e ajustado a um volume final de 80 mL com água deionizada estéril. Adicionou-se 400 µL de uma solução a 10% de persulfato de amônio e 45 µl de TEMED (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). Imediatamente após a homogeneização procedeu-se a preparação do gel entre duas placas de vidros com espaçadores de 0,4 mm para polimerização do mesmo.

A parte externa da placa contendo o gel foi então lavada cuidadosamente em água corrente e em água deionizada e colocada para

secar. A placa contendo o gel, assim preparada, foi adaptada ao seqüenciador e colocado o pente “dente de tubarão” para aplicação das amostras.

3.5.7 Preparação e realização de eletroforese das amostras obtidas nos ciclos de seqüenciamento

As amostras purificadas foram desnaturadas a temperatura de 90°C durante 2 minutos em 0,8 µl de tampão de aplicação Blue Dextram/EDTA (ABI PRISM - Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) e imersas imediatamente em gelo.

Um volume de 1,5 µL de cada amostra, assim preparado, foi aplicado no gel de poliacrilamida, e a eletroforese estabelecida a 600V durante 12 horas em seqüenciador ABI PRISMA 373XL (P E Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.5.8 Análise do eletroferograma para detecção de mutações

A análise do eletroferograma para detecção de mutação nas amostras estudadas foi realizada usando-se o programa ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software version 3.0 (P E Applied Biosystems, Foster City, USA). Os resultados obtidos foram comparados com seqüências publicadas no GenBank para os genes *katG*, *kasA*, *inhA* (regiões promotora e estrutural) e região intergênica *oxyR-ahpC*.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da microdiluição em placa (MABA)

Os resultados da determinação da CIM pelo método da microdiluição em placa (MABA), da INH para os 97 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes estão apresentados no anexo F.

Esquema ilustrativo do teste da CIM pelo MABA pode ser observado na Figura 5.

Figura 5. Representação da CIM pela técnica do MABA após revelação com Alamar Blue. Os isolados de *M. tuberculosis* presentes nas posições B, F e G apresentaram CIM de 2 µg/mL; na E CIM de 4 µg/mL; na C de 32 µg/mL e na D de ≤0,25 µg/mL. Na coluna 10 para cada posição (B a G) foi realizado o controle de crescimento dos isolado de *M. tuberculosis*. Na coluna 11 foi realizado o controle de esterilidade do teste.

Na Tabela 16, está apresentada a distribuição dos diferentes valores da CIM com seus respectivos números de isolados e porcentagem.

Tabela 16. Distribuição relativa em relação a concentração inibitória da INH, para os 97 isolados resistentes de *M. tuberculosis*, pelo método da microdiluição em placa utilizando Alamar Blue como agente revelador.

CIM $\mu\text{g/mL}$	Nº de isolados	Porcentual (%)
$\leq 0,25$	0	0
0,5	0	0
1	2	2,1
2	4	4,1
4	27	27,8
8	21	21,7
16	14	14,4
32	7	7,2
> 32	20	20,6
Sem resultado	2	2,1
Total	97	100

A CIM dos 3 isolados de *M. tuberculosis* sensíveis a INH (36, 4851 e 17711) e da cepa padrão H37Rv com sensibilidade conhecida a INH, como esperado, foram inferiores a diluição 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

4.2 Caracterização molecular dos isolados de *M. tuberculosis*

A caracterização molecular dos 97 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes e dos 60 isolados sensíveis a INH foi realizada pela técnica de "Spoligotyping" (Figura 6). Todos os 157 isolados apresentaram perfis de hibridação característicos de *M. tuberculosis*, ou seja não apresentaram hibridação com os oligonucleotídeos dos espaçadores 33 a 36. As exceções foram os isolados 3401/00 e 3408/00 que apresentaram genótipos

de *M. tuberculosis* "grupo Beijing" e hibridizaram somente com os espaçadores 35 a 43.

Foram obtidos 60 padrões de "Spoligotyping" com os 157 isolados de *M. tuberculosis* e estes estão descritos no anexo B. Os 97 isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH e os 60 sensíveis foram agrupados respectivamente em 40 e 30 padrões diferentes de "Spoligotyping" (Anexo F).

Figura 6. Foto do filme de raio X mostrando uma membrana revelada da reação de hibridação da técnica de "Spoligotyping". As linhas de 1 a 40 contém isolados que foram caracterizados como *M. tuberculosis* pois não apresentaram os espaçadores de 33 a 36. As linhas 41, 42 e 43 contém os três controles da técnica: controle negativo da PCR para o locus DR, *M. tuberculosis* H37RV e *M. bovis* respectivamente. As linha 15 e 21 contém os isolados que apresentaram perfil de "Spoligotyping" característico de "Grupo Beijing".

4.3 Triagem de mutações nos genes relacionados com resistência a INH em isolados de *M. tuberculosis* pela técnica de PCR-SSCP

4.3.1 Obtenção de produtos da PCR das regiões adjacentes aos codons 315 e 463 do gene *katG*

Na Figura 7, pode-se observar os fragmentos de 145 pb e 162 pb obtidos pela PCR das regiões adjacentes aos codons 315 e 463 do gene *KatG*, respectivamente.

Figura 7. Fotografia do gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos de 145 pb e 162 pb amplificados pela PCR das regiões adjacentes aos codons 315 (A) e 463 (B) do gene *katG* respectivamente, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. Em A) a esquerda, amostras nas posições 1 a 12 e marcador de tamanho molecular de DNA (100 pb) em M e a direita controle negativo da PCR em CN. Em B) a esquerda marcador de tamanho molecular de DNA (100 pb) em M e amostras nas posições de 1 a 6 e a direita controle negativo da PCR em CN.

4.3.2 Obtenção dos produtos de PCR para as regiões promotora e estrutural do gene *inhA*

Na Figura 8, pode-se observar os fragmentos de 187 pb, 222 pb e 172 pb obtidos pela PCR da região promotora e das regiões adjacentes aos codons 16 e 94 do gene *inhA*, respectivamente.

Figura 8. Fotografia do gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados pela PCR das regiões promotora (A) e adjacentes aos codons 16 (B) e 94 (C) do gene *inhA*, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation: A esquerda, amostras nas posições 1 a 8 e controle negativo da PCR em CN, a direita marcador de tamanho molecular de DNA (100 pb) em M.

4.3.3 Obtenção de produtos de PCR para a região intergênica *oxyR-ahpC*

Na Figura 9, pode-se observar o fragmento de 264 pb obtidos pela PCR da região intergênica *oxyR-ahpC* onde está localizada uma provável região regulatória do gene *ahpC*.

Figura 9. Fotografia do gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados pela PCR da região intergênica *oxyR-ahpC*, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation: A esquerda, amostras nas posições 1 a 8 e controle negativo da PCR em CN, a direita marcador de tamanho molecular de DNA (100 pb) em M.

4.3.4 Obtenção de 6 fragmentos pela PCR do gene *kasA*

O gene *kasA* foi amplificado em toda a sua extensão pela utilização de seis pares de iniciadores com sobreposição. Os resultados mostram os fragmentos KasA 1 (272 pb), KasA 2 (267 pb), KasA 3 (269 pb), KasA 4 (263 pb), KasA 5 (223 pb) e KasA 6 (255 pb) obtidos pela amplificação pela PCR utilizando os iniciadores *kasA1* e *kasA1R*, *kasA2* e *kasA 2R*, *kasA 3* e *kasA 3R*, *kasA 4* e *kasA 4R*, *kasA 5* e *kasA 5R* e *kasA 6* e *kasA 6R*, respectivamente (Figura 10).

Figura 10. Fotografia do gel de agarose a 1,5% demonstrando os 6 fragmentos amplificados pela PCR do gene *kasA*, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation: Para os painéis A (*kasA1*), B (*kasA 2*), D (*kasA 4*), E (*kasA 5*) a esquerda, amostras nas posições 1 a 4 e controle negativo da PCR em CN, a direita marcador de tamanho molecular de DNA (100 pb) em M. Para os painéis C (*kasA 3*) e F(*kasA 6*) amostras em 1 a 4, e controle negativo da PCR em CN, a esquerda marcador de tamanho molecular de DNA (100 pb) em M.

4.3.5 Detecção de mutações gênicas pela técnica de SSCP

4.3.5.1 Otimização da técnica de SSCP

As condições eletroforéticas para a avaliação dos perfis de migração, dos fragmentos amplificados das regiões específicas dos genes relacionados com a resistência a INH foram previamente otimizadas pelo uso de um grupo de 5 isolados resistentes e 5 sensíveis a INH e a cepa padrão H37Rv.

Foram otimizadas condições eletroforéticas para as regiões adjacentes aos codons 315 e 463 do gene *katG*, regiões promotora e adjacentes aos códons 16 e 94 do gene *inhA*, região intergênica *oxyR-ahpC*, e 6 fragmentos com sobreposição das extremidades 5' e 3' para avaliar o gene *kasA* em toda a sua extensão. Durante a otimização foram avaliadas diferentes condições eletroforéticas que incluíram o uso de 5 temperaturas diferentes (5°C, 8°C, 12°C, 13°C e 15°C), tempos (1 hora e 30 minutos a 3 horas) e voltagem (300, 350, 400, 500 e 600 V) durante a separação eletroforética.

O resultado desta otimização possibilitou a escolha das condições ideais para visualizar os perfis eletroforéticos dos fragmentos, permitindo aumentar a sensibilidade da triagem de mutações (Tabela 17).

Tabela 17. Resultado da otimização das condições para realização da técnica de SSCP em GeneGel Excel (Amersham-Biosciences, Uppsala, Suécia), que permitiu a triagem de mutações nos genes relacionados com resistência a INH em isolados de *M. tuberculosis*.

Iniciadores	Voltagem (V)	Temperatura (°C)	Tempo (horas)
katG 315F e 315R	350	12	2:00
katG 463F e 463R	400	8	2:00
inhA 1F e 1R	350	12	2:00
inhA 16 e 17R	350	12	2:00
inhA 94 e 94R	400	12	2:00
ahpC F e ahpC R	400	12	2:00
kasA 3 e 3R; 5 e 5R	600	13	2:00
kasA 2 e 2R; 6 e 6R	450	8	2:00
kasA 4 e 4R; 1 e 1R	500	13	2:00

4.3.5.2 Análise do perfil de SSCP para triagem de mutações nas regiões adjacentes aos codons 315 e 463 do gene *katG*

A Figura 11 mostra a fotografia do gel de poliacrilamida com os perfis eletroforéticos de fragmentos de DNA, obtidos pela amplificação da região adjacente ao codon 315 do gene *katG*. Observa-se na posição 1, 7 e 14 o controle H37Rv, considerado como negativo para a presença de mutação no codon 315 do gene *katG*.

Analisando-se os perfis de SSCP pode-se observar que nas posições 3, 4, 9 e 12 os perfis de migração eletroforética se assemelham ao controle H37Rv sugerindo a ausência de mutações. Nas posições 2, 5, 6, 8, 10, 11 e 13 os perfis de migração eletroforética das fitas de DNA se distinguem visivelmente do controle sugerindo presença de mutações, sendo que nestas posições pode ser observada a presença de 6 diferentes perfis eletroforéticos.

Região adjacente ao codon 315 do gene *katG*

Figura 11. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando iniciadores que flanqueiam a região que contém o codon 315 do gene *katG*. Nas posições 1, 7 e 14 foram colocado o controle H37Rv e nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13 foram colocados os isolados 2193/00, 68A, 21844, 5355, 1091, 2148/01, 4850, 37-C, 63A, 302, 17204 respectivamente. O * indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

A Figura 12 mostra a fotografia do gel de poliacrilamida com os perfis eletroforéticos dos fragmentos de DNA obtidos pela amplificação da região adjacente ao codon 463 do gene *katG*. Observa-se na posição 7 o controle H37Rv, considerado como negativo para a presença de mutação no codon 463 do gene *katG*. Analisando os perfis de SSCP pode-se observar que nas posições 1, 2, 4, 5 e 6 os perfis de migração eletroforéticas se assemelham ao controle H37Rv sugerindo a ausência de mutação. Na posição 3 o perfil de migração eletroforética das fitas de DNA apresenta migração diferente, sugerido a presença de mutação nesta região gênica.

Região adjacente ao codon 463 do gene *katG*

Figura 12. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata, representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores que flanqueiam a região que contém o codon 463 do gene *katG*. Na posição 7, foi colocado o controle H37Rv e nas posições 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram colocados os isolados 3360/00, 2148/00, 3408/00, 74A, 73A, 72A respectivamente. O * indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

4.3.5.3 Análise do perfil de SSCP para triagem de mutações nas regiões promotoras e adjacentes aos codons 16 e 94 do gene *inhA*

As Figuras 13, 14 e 15 mostram as fotografias do gel de poliacrilamida com os perfis eletroforéticos dos fragmentos de DNA, obtidos pela amplificação da região promotora e regiões adjacentes aos códons 16 e 94 do gene *inhA*.

Na Figura 13, observa-se nas posições 1 e 6 o controle H37Rv, considerado como negativo para a presença de mutação na região promotora do gene *inhA*. Avaliando-se os perfis de SSCP pode-se observar que nas posições 4 e 5 os perfis de migração eletroforética se assemelham ao controle H37Rv sugerindo a ausência de mutações. Nas posições 2, 3, 7, 8, 9 e 10 o perfil de migração eletroforético das fitas de DNA se distingue visivelmente do controle sugerindo a presença de mutação, sendo que nestas posições pode ser observada a presença de 2 diferentes perfis eletroforéticos.

Região promotora do gene *inhA*

Figura 13. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores que flanqueiam a região promotora do gene *inhA*. Nas posições 1 e 6, foram colocados o controle H37Rv e nas posições 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, foram colocados os isolados 4850, 5355, 12877, 21653, 973, 71-C, 118, 30A respectivamente. O * indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

Na Figura 14, observa-se nas posições 1, 6 e 10 o controle H37Rv, considerado como negativo para a presença de mutação na região adjacente ao codon 16 do gene *inhA*.

Ao analisar os perfis de SSCP pode-se observar que nas posições 3 e 8 o perfil de migração eletroforética se assemelha ao do controle H37Rv sugerindo a ausência de mutação. Nas posições 2, 4, 5, 7 e 9, os 3 diferentes perfis eletroforéticos de migração das fitas de DNA, se distinguem visivelmente do perfil do controle, sugerindo a presença de mutação.

Região adjacente ao codon 16 do gene *inhA*

Figura 14. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores que flanqueiam a região que contém o codon 16 do gene *inhA*. Nas posições 1, 6 e 10 foram colocados o controle H37Rv e nas posições 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, foram colocados os isolados 6257, 4509, 148-S, 64A, 803/01, 6230 e 30A respectivamente. O * indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutações.

Na Figura 15, observa-se nas posições 1 e 6 o controle H37Rv, considerado como negativo para a presença de mutação na região adjacente ao codon 94 do gene *inhA*.

Analisando-se os perfis de SSCP pode-se observar que nas posições 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9 os perfis de migração eletroforética se assemelham ao do controle H37Rv sugerindo a ausência de mutações.

Região adjacente ao codon 94 do gene *inhA*

Figura 15. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores que flanqueiam a região que contém o codon 94 do gene *inhA*. Nas posições 1 e 6 foram colocados o controle H37Rv e nas posições 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, foram colocados os isolados 35A, 37A, 38A, 39A, 4M, 46-S e 1778 respectivamente.

4.3.5.4 Análise do perfil de SSCP para triagem de mutações na região intergênica *oxyR-ahpC*

A Figura 16 mostra a fotografia do gel de poliacrilamida dos fragmentos de DNA obtidos pela amplificação da região intergênica *oxyR-ahpC*. Observa-se nas posições 1, 7 e 13 o controle H37Rv, considerado como negativo para a presença de mutação na região intergênica *oxyR-ahpC*.

Pode-se observar que nas posições 3 e 4 os perfis de migração eletroforética se assemelham ao do controle H37Rv sugerindo a ausência de mutação. Nas posições 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 os perfis de migração eletroforética das fitas de DNA se distinguem visivelmente do controle

sugerindo a presença de mutação. Nesta região gênica pôde ser observada a presença de 8 diferentes perfis eletroforéticos.

Região intergênica *oxyR-ahpC*

Figura 16. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores que flanqueiam a região intergênica *oxyR-ahpC*. Nas posições 1, 7 e 13 foram colocados o controle H37Rv e nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, foram colocados os isolados 17433, 29A, 30A, 44A, 68A, 211-S, 57A, 27A, 46-S, 148-S respectivamente. O * indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

4.3.5.5 Análise do perfil de SSCP para triagem de mutações no gene *kasA*

A triagem de mutações no gene *kasA*, em toda a sua sequência, foi realizada analisando-se 6 fragmentos de DNA (KasA 1, kasA 2, kasA 3, kasA 4, kasA 5, e kasA 6) com sobreposição das sequências em suas extremidades 5' e 3'. Os 6 fragmentos de DNA foram obtidos pela amplificação de regiões específicas do gene *kasA* com iniciadores selecionados para cada região (Tabela 2).

Na Figura 17, observa-se nas posições 1 e 7 os perfis de migração eletroforética dos fragmentos de DNA da região kasA 1 da cepa H37Rv, empregada como controle negativo para a presença de mutação, que foi obtido pela amplificação utilizando os iniciadores kasA 1F e kasA 1R. Avaliando-se os perfis de SSCP, pode-se observar que nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e

12, os perfis de migração eletroforética das fitas de DNA se assemelham ao do controle H37Rv sugerindo ausência de mutações.

Figura 17. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores kasA 1F e kasA 1R. Nas posições 1 e 7 foram colocados o controle H37Rv e nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 foram colocados os isolados 2542, 227, 3543/00, 6230, 114, 6257, 2542, 227, 6230, 114 respectivamente.

Na Figura 18, observa-se nas posições 1 e 8 os perfis de migração eletroforética dos fragmentos de DNA da região kasA 2 da cepa H37Rv, empregada como controle negativo para a presença de mutações, que foi obtido pela amplificação utilizando os iniciadores kasA 2F e kasA 2R. Avaliando-se os perfis de SSCP, pode-se observar que nas posições 2, 3, 4, 5, 6 e 7 os perfis de migração eletroforética das fitas de DNA se assemelham ao do controle H37Rv sugerindo a ausência de mutações.

Figura 18. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores kasA 2F e kasA 2R. Nas posições 1 e 8 foram colocados o controle H37Rv e nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 7 foram colocados os isolados 2542, 227, 3543/00, 6230, 114, 6230 respectivamente.

Na Figura 19, observa-se nas posições 1 e 7 os perfis de migração eletroforética dos fragmentos de DNA da região *kasA* 3 da cepa H37Rv, empregada como controle negativo para a presença de mutação na região *kasA* 3, que foi obtido pela amplificação utilizando os iniciadores *kasA* 3F e *kasA* 3R.

Nas posições 6, 8, 9, 10, 11 e 12 pode-se observar perfis de migração eletroforética das fitas de DNA, semelhante ao do controle H37Rv, o que sugere a ausência de mutações. Nas posições 2, 3, 4, 5, os perfis de migração eletroforética das fitas de DNA se distingue visivelmente ao do controle sugerindo a presença de mutação. Nesta região gênica pôde ser observado a presença de 2 perfis eletroforéticos diferentes.

Figura 19. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores *kasA* 3F e *kasA* 3R. Na posição 1 e 7 foram colocados o controle H37Rv e nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 os isolados 18044, 7188, 14972, 3693, 106, 36, 64A, 2542, 227, 3543/00 respectivamente. O * indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

Na Figura 20, observa-se nas posições 1, 7 e 13 os perfis de migração eletroforética dos fragmentos de DNA da região *kasA* 4 da cepa H37Rv, empregada como negativo para a presença de mutação, que foi obtido pela amplificação utilizando os iniciadores *kasA* 4F e *kasA* 4R. Avaliando-se os perfis de SSCP pode-se observar que nas posições 8 e 10 os perfis de migração eletroforética se assemelham ao do controle H37Rv sugerindo a ausência de mutações. Nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11 e 12 o perfil de migração eletroforética das fitas de DNA se distinguem visivelmente do

controle, sugerindo a presença de mutação. Nestas posições pôde ser observada presença de 1 único perfil eletroforético diferente.

Figura 20. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata, representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores kasA 4F e kasA 4R. Nas posições 1, 7 e 13 foram colocados o controle H37Rv e nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 os isolados 5039, 405, João K, 21844, 6230, 23417, 1264, 114, 2542 e 6257 respectivamente. O * indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

Na Figura 21, observa-se nas posições 1, 4 e 9 os perfis de migração eletroforética dos fragmentos de DNA da região kasA 5 da cepa H37Rv, considerada como controle negativo para a presença de mutação, que foi obtida pela amplificação utilizando os iniciadores kasA 5F e kasA 5R.

Nas posições 3, 5, 6, 7 e 8 pode-se observar perfis de migração eletroforética semelhante ao do controle H37Rv sugerindo a ausência de mutações. Na posição 2 o perfil de migração eletroforética das fitas de DNA se distinguem visivelmente do controle, sugerindo a presença de mutação. Nesta região gênica (kasA 5) foi encontrada somente um isolado contendo esta mutação.

Figura 21. Fotografia do gel de SSCP (poliacrilamida) corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores kasA 5F e kasA 5R, do gene kasA. Nas posições 1, 4 e 9 foram colocados o controle H37Rv e nas posições 2, 3, 5, 6, 7 e 8, os isolados 11896, 16, 64A, 3543/00, 2542, 227 respectivamente. O * indica perfil de SSCP sugestivo de presença de mutação.

Na Figura 22, observa-se nas posições 1, 8 os perfis eletroforético dos fragmentos de DNA da região kasA 6 da cepa H37Rv, empregada como controle negativo para a presença de mutação, que foi obtido pela amplificação utilizando os iniciadores kasA 6F e kasA 6R. Avaliando-se os perfis de SSCP pode-se observar que nas posições 2, 3, 4, 5, 6 e 7 os perfis de migração eletroforética se assemelham ao do controle H37Rv sugerindo a ausência de mutações.

Figura 22. Fotografia do gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata representando os produtos obtidos pela PCR utilizando os iniciadores kasA 6F e kasA 6R do gene kasA. Nas posições 1 e 8 foram colocados o controle H37Rv e nas posições 2, 3, 4, 5, 6, e 7, os isolados 2542, 227, 3543/00, 6230, 114 e 6257 respectivamente.

4.4 Alterações moleculares identificadas nos genes relacionados com resistência a INH em isolados de *M. tuberculosis*, pela técnica de seqüenciamento semi-automático

4.4.1 Amplificação dos genes pela PCR para realização do seqüenciamento semi-automático

Todos os isolados que apresentaram fragmentos de genes com perfil de SSCP diferente do perfil de SSCP dos fragmentos de genes da cepa padrão sensível H37Rv tiveram seus DNAs amplificados novamente, utilizando-se os iniciadores que flanqueiam regiões maiores às utilizadas na PCR-SSCP para triagem, segundo recomendação do laboratório de tuberculose (NCID-DAST-TB/Mycobacteriology branch) do CDC, USA. Alguns isolados resistentes no teste fenotípico (CIM), mesmo apresentando perfil de SSCP sugerindo ausência de mutação, assim como, alguns isolados sensíveis a INH tiveram alguns dos fragmentos gênicos amplificados novamente para realização do seqüenciamento.

Na Tabela 18 estão descritos os percentuais de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a INH que apresentaram mutações nos genes *katG*, *inhA*, *kasA* e região intergênica *oxyR-ahpC*. Os isolados que não apresentaram mutações nas regiões adjacentes aos códons 315 e 463 do gene *katG*, na região promotora e regiões adjacentes aos códons 16 e 94 do gene *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC*, tiveram todo o gene *katG* seqüenciado.

As mutações nos genes com as respectivas mudanças de aminoácidos na seqüência protéica avaliadas nos isolados com resistência e sensibilidade a INH estão relacionadas nas Tabelas 18 e 19, respectivamente.

Pode-se observar, na Tabela 18, as 28 novas mutações, sendo que 25 foram identificadas no gene *katG*, uma na região intergênica *oxyR-ahpC*, uma na região estrutural do gene *inhA* e uma na região estrutural do gene *ahpC*, contudo estas duas últimas não levam a alteração do aminoácido na seqüência protéica. Na Tabela 19, observa-se nos isolados sensíveis,

mutações já relatadas por ZHANG & TELENTI (2000) e mutações novas detectadas em isolados de *M. tuberculosis* de origem brasileira.

Quatro isolados resistentes a INH não apresentaram mutações significativas, nos genes estudados, que pudessem ser responsabilizadas pela resistência apresentada. Entre estes, dois (2,1%) não apresentaram mutação em nenhum dos genes estudados, 1 (1%) apresentou mutação G269S no gene *kasA* e outro mutação somente na posição – 39 da região intergênica *oxyR-ahpC*.

Tabela 18. Porcentagem de isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH que apresentaram mutações no codon 315 e na região adjacente ao codon 315 no gene *katG*, regiões promotora e adjacentes aos codons 16 e 94 do gene *inhA*, região intergênica *oxyR-ahpC* e gene *kasA*.

Região Gênica	Num. de isolados	Porcentagem (%)
<i>katG</i> 315	60	61,9
Outros códons do gene <i>katG</i>	24	24,7
Região promotora de <i>inhA</i>	26	26,8
Região adjacente ao codon 16 do gene <i>inhA</i>	6*	6,2
Região adjacente ao codon 94 do gene <i>inhA</i>	0	0
Região intergênica <i>oxyR-ahpC</i>	10	10,3
<i>kasA</i>	13	13,4

Observação: 1 isolado apresentou mutação silenciosa

Tabela 19. Relação das mutações identificadas nos genes *katG*, *kasA*, *inhA* e regiões promotoras de *inhA* e *ahpC*, em 97 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH.

Gene	Nº total de mutações	Mudança em		Referência	Porcentagem
		Nº do nucleotídeo	Aminoácido		
<i>katG</i>	1	Ins. A na posição 17	Frameshift	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	T→C na posição 271	W91→R	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	A→G na posição 290	H97→R	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	C→T na posição 326	A109→V	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	C→T na posição 329	A110→A*	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	C→T na posição 431	A144→V	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	2	A→G na posição 598	L200→E	Mutação nova	2.1%
<i>katG</i>	1	C→G na posição 695	P232→R	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	G→T na posição 761	R254→L	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	G→T na posição 817	G273→C	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	G→A na posição 836	G279→D	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	2	C→G na posição 877	L293→V	Mutação nova	2.1%
<i>katG</i>	1	G→A na posição 895	G299→S	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	A→C na posição 904	S302→R	ZHANG & TELENTI (2000)	1%
<i>katG</i>	1	A→G na posição 943	S315→G	ZHANG & TELENTI (2000)	1%
<i>katG</i>	1	A→C na posição 943	S315→R	ZHANG & TELENTI (2000)	1%
<i>katG</i>	49	G→C na posição 944	S315→T	ZHANG & TELENTI (2000)	50.5%
<i>katG</i>	7	G→A na posição 944	S315→N	ZHANG & TELENTI (2000)	7.2%
<i>katG</i>	1	G→T na posição 944	S315→I	ZHANG & TELENTI (2000)	1%
<i>katG</i>	1	C→G na posição 945	S315→R	ZHANG & TELENTI (2000)	1%
<i>katG</i>	1	G→C na posição 1022	W341→S	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	G→T na posição 1255	D419→Y	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	A→C na posição 1256	D419→A	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	C→A na posição 1257	D419→E	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	Ins. T na posição 1311	Frameshift	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1*	Ins. A na posição 1329	Frameshift	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1*	Del. C na posição 1339	Frameshift	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	G→T na posição 1388	R463→L	ZHANG & TELENTI (2000)	1%
<i>katG</i>	1	G→A na posição 1468	G490→S	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	C→T na posição 1833	L611→L*	ZHANG & TELENTI (2000)	1%
<i>katG</i>	1	Del. após posição 1845	Término do gene	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	T→G na posição 1985	L662→R	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	G→A na posição 2176	A726→T	Mutação nova	1%
<i>katG</i>	1	Del. C na posição 2139	Frameshift	Mutação nova	1%
Promotora <i>inhA</i>	23	C→T na posição -15	NA	ZHANG & TELENTI (2000)	23.7%
Promotora <i>inhA</i>	2	G→T na posição -17	NA	ZHANG & TELENTI (2000)	2.1%
Estrutural <i>inhA</i>	1	A→G na posição 61	I21→V	ZHANG & TELENTI (2000)	1%
Estrutural <i>inhA</i>	4	T→C na posição 62	I21→T	ZHANG & TELENTI (2000)	4.1%
Estrutural <i>inhA</i>	1	C→T na posição 130	L44L*	Mutação nova	1%
oxyR- <i>ahpC</i>	2	G→A na posição -9	NA	ZHANG & TELENTI (2000)	2.1%
oxyR- <i>ahpC</i>	1	C→T na posição -10	NA	ZHANG & TELENTI (2000)	1%
oxyR- <i>ahpC</i>	1	C→T na posição -12	NA	ZHANG & TELENTI (2000)	1%
oxyR- <i>ahpC</i>	1	C→T na posição -15	NA	ZHANG & TELENTI (2000)	1%
oxyR- <i>ahpC</i>	4	C→T na posição -39	NA	ZHANG & TELENTI (2000)	4.1%
oxyR- <i>ahpC</i>	1	G→A na posição -48	NA	Mutação nova	1%
<i>ahpC</i>	1	T→C na posição 30	I10→I*	Mutação nova	1%
KasA	13	G→A na posição 805	G269→S	ZHANG & TELENTI (2000)	13.4%

Observações: Del, deleção; Ins, inserção; a, mutação no mesmo isolado; *, não ocorre mudança de aminoácidos; NA, não aplicável.

Tabela 20. Relação das mutações identificadas nos genes *kasA*, *ahpC* e região intergênica *oxyR-ahpC*, em 60 isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis a INH.

Gene	Nº total de Mutações	Mudança em		Referência	Porcentagem
		Nº do nucleotídeo	Aminoácido		
<i>kasA</i>	1	T→C na posição 447	G149→G*	Mutação nova	1,7%
<i>kasA</i>	3	C→T na posição 540	H180→H*	Mutação nova	5,0 %
<i>kasA</i>	10	G→A na posição 805	G269→S	ZHANG & TELENTI (2000)	16,6%
<i>kasA</i>	1	C→A na posição 954	G318→G*	Mutação nova	1,7%
<i>ahpC</i>	4	T→C na posição 30	I10→I*	Mutação nova	6,7%
Prox. <i>oxyR</i>	1	C→A na posição -124	NA	-	1,7%

Observação: *, não ocorre mudança de aminoácidos; NA, não aplicável.

4.5 Avaliação da associação entre as mutações no gene *kasA* e resistência a INH em isolados clínicos de *M. tuberculosis*

Na Tabela 21, pode ser verificado o percentual de isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes a INH que apresentaram mutações no gene *kasA*. Foi observado um alto percentual de isolados sensíveis a INH com mutação no gene *kasA* (23,3%), incluindo mutações silenciosas que não levam alteração do aminoácido na sequência protéica.

Tabela 21. Total de isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes a INH que apresentaram mutações no gene *kasA*.

Isolados	Sem mutação	Com mutação	Total
Sensíveis	46(76,7%)	14(23,3%)	60 (100%)
Resistentes	84(86,6%)	13(13,4%)	97 (100%)

4.6 Relação entre valores da CIM e as mutações encontradas nos isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH

A relação entre a CIM para INH e as mutações encontrada nos principais genes relacionadas com resistência a INH em isolados clínicos de *M. tuberculosis* pode ser observada nas Tabelas 22 e 23.

Pode-se observar que a detecção de mutação pela técnica de SSCP empregando 5 regiões gênicas (região adjacente aos codons 315 do gene *katG*, 16 e 94 do gene *inhA*, regiões promotoras do gene *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC*) apresentou excelente sensibilidade (90,7%) para a detecção de resistência em isolados de *M. tuberculosis* com variação do valor da CIM de 1 a > 32 µg/mL. Os 9,3% dos isolados restantes que não apresentaram perfil de SSCP alterado para os genes estudados e que tiveram CIM com valores > 0,5 µg/mL, apresentaram mutações em posições diferentes do codon 315 no gene *katG* e que não foram detectadas devido ao tamanho do fragmento de DNA obtido pela PCR utilizando os iniciadores KatG 315F e KatG 315R. Inclui-se nesta porcentagem, 3 isolados sem mutações significativas nos genes estudados.

Tabela 22. CIM para INH e número total de mutações encontradas nos genes *katG*, *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC* em 97 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH.

CIM (µg/ml)	Promotor <i>inhA</i>	<i>inhA</i> (promotor + estrutural)	<i>katG</i> não 315	<i>KatG</i> não 315 + <i>oxyR-ahpC</i>	<i>katG</i> 315	<i>KatG</i> 315 + promotor de <i>inhA</i>	<i>katG</i> 315+ <i>inhA</i> (promotor + estrutural)	<i>KatG</i> 315 + <i>inhA</i> (prom. + estrut.) + <i>oxyR-ahpC</i>
≤0,25								
0,5								
1,0	1		1			1	1	1
2,0	2 (1*)		1			3	3	3
4,0	1*				26	27	27	27
8,0	1	1*	3	1	16	20	20	21
16,0		2 (1*)	6	1	7	12	13	13
32,0			3		4	5	5	5
>32,0	1*	1	10	7	7	11	12	18
TOTAL	6 (6,2%)	4 (4,1%)	24 (24,7%)	9 (9,3%)	60 (61,9%)	79 (81,4%)	81 (83,5%)	88 (90,7%)

* O gene *katG* não foi seqüenciado por inteiro em toda a sua extensão

Tabela 23. Percentual de isolados de *M. tuberculosis* que apresentaram CIM com valor acima de 0,5 µg/ml em relação ao perfil de SSCP obtido para os genes *katG* (região adjacente ao códon 315), *inhA* (regiões promotora e adjacentes aos codons 16 e 94), e região intergênica *oxyR-ahpC* para os 97 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH.

Perfil de SSCP	Isolados com CIM > 0,5 µg/mL
Alterado	88 (90,7%)
Sem alteração	9 (9,3%)
TOTAL	97 (100%)

4.7 Análise da concordância entre a técnica de PCR-SSCP e a de seqüenciamento semi-automático para detecção de mutações em genes relacionados com resistência a INH em *M. tuberculosis*.

A concordância entre os resultados obtidos com a técnica de PCR-SSCP em relação ao seqüenciamento semi-automático analisando regiões específicas dos genes *katG*, *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC* pode ser observada nas Tabelas 24 a 27. A técnica de triagem mostrou-se altamente sensível e com 100% de concordância com o seqüenciamento.

Neste estudo relacionou-se a sensibilidade da técnica de PCR-SSCP em detectar mutações nas regiões citadas não considerando a presença de mutações que não induzem a alteração de aminoácidos na seqüência protéica como ocorreram na análise de concordância para as regiões adjacentes aos codons 16 do gene *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC*.

Entre os isolados sensíveis a INH, 5 apresentaram perfil de PCR-SSCP alterado quando da amplificação da região intergênica *oxyR-ahpC*. Foi realizado o sequenciamento semi-automático desta região e observou-se que 4 isolados apresentavam mutação silenciosa na região estrutural do gene *ahpC* e 1 próximo ao início do gene *oxyR*.

Tabela 24. Porcentagem de concordância entre o perfil de PCR-SSCP e o seqüenciamento para detectar mutações no codon 315 do gene *KatG* para os 97 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH.

Perfil de SSCP	Seqüenciamento	
	Sem Mutação	Com Mutação
Sem alteração	100%	0%*
Alterado	0%	100%

* 1 isolado resistente com mutação no codon 302 do gene *katG*

Tabela 25. Porcentagem de concordância entre PCR-SSCP e o seqüenciamento para detectar mutações na região promotora do gene *inhA* para os 97 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH.

Perfil de SSCP	Seqüenciamento	
	Sem Mutação	Com Mutação
Sem alteração	100%	0%
Alterado	0%	100%

Tabela 26. Porcentagem de concordância entre PCR-SSCP e o seqüenciamento para detectar mutações na região estrutural (região 16 e 94) do gene *inhA*, para os 97 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH.

Perfil de SSCP	Seqüenciamento	
	Sem Mutação	Com Mutação
Sem alteração	100%	0%
Alterado	0%	100%*

* 1 isolado com mutação silenciosa na região adjacente ao codon 16 do gene *inhA* que não leva a alteração do aminoácido na seqüência protéica.

Tabela 27. Porcentagem de concordância entre PCR-SSCP e o seqüenciamento para detectar mutações na região intergênica *oxyR-ahpC*, para os 97 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH.

Perfil de SSCP	Seqüenciamento	
	Sem Mutação	Com Mutação
Sem alteração	100%	0%
Alterado	0%	100%*

* 1 isolado resistente apresentou mutação silenciosa na seqüência estrutural do gene *ahpC*, que não leva a alteração do aminoácido na seqüência protéica.

5. DISCUSSÃO

i

O maior desafio para os profissionais das Ciências Farmacêuticas na era pós-genoma é encontrar meios terapêuticos adequados com maior especificidade, menor efeito colateral e dose individualizada. Isto só será possível quando se conhecer a relação fenótipo:genótipo e sem dúvida se o diagnóstico precoce e adequado das doenças forem realizados. Nas infecções bacterianas o teste rápido de detecção, identificação e de determinação de sensibilidade torna fundamental para a melhorar a eficácia terapêutica.

A tuberculose é uma doença que desafia a ciência devido as suas peculiaridades, tanto pela demora e dificuldade do seu diagnóstico, quanto pelo tratamento prolongado. Uma triste realidade acompanha esta afecção, que acomete principalmente populações carentes e desnutridas, assim como os que se encontram em estado de imunodepressão como nos doentes com AIDS. Sem dúvida, as dificuldades encontradas na detecção da resistência as drogas terapêuticas utilizadas e uma inadequada terapia tem contribuído de forma significativa na eclosão de cepas de *M. tuberculosis* com multirresistência. Os métodos correntes utilizados para essa finalidade são laboriosos, demorados e ainda pouco acessíveis para pequenos centros de diagnóstico, pois necessitam de uma adequação física do local de trabalho, além de um treinamento adequado dos profissionais.

O procedimento terapêutico atual é de eficácia comprovada na cura da tuberculose, quando cumprido adequadamente. No entanto, observa-se falhas significativas, se não for seguido adequadamente. No Brasil o índice de abandono é bastante significativo e a nossa realidade mostra que este é o principal responsável pelo surgimento ou seleção de cepas com resistência aos quimioterápicos utilizados (FIÚZA DE MELO & AFIÚNE, 1993). O mecanismo exato do aparecimento das cepas de *M. tuberculosis* resistentes ainda não está claro. Certos mecanismos de resistência tem sido propostos e relacionados com mutações em alguns genes (MORRIS *et al.*, 1995; COOKSEY *et al.*, 1996b; NACHAMKIM *et al.*, 1997; TELENTI *et al.*, 1997; TEMESGEN *et al.*, 1997; COOKSEY *et al.*, 2000; FLUIT *et al.*, 2001; SIDDIQI *et al.*, 2002).

A INH ou hidrazida do ácido isonicotínico foi sintetizada bem no início do século XX, em 1912 por dois pesquisadores da Checoslovaquia, porém foi utilizada para o tratamento da tuberculose somente a partir de 1952 (HEYM *et al.*, 1999). A INH é um fármaco potente contra as bactérias do complexo *M. tuberculosis*, sendo atualmente usada no tratamento e na quimioprevenção da tuberculose.

A INH é cerca de 100 vezes mais ativa contra o *M. tuberculosis*, do que em relação ao *M. avium* e outras micobactérias. Tal especificidade tem sido atribuída a diferenças de permeabilidade da parede celular dessas espécies (MDLULI *et al.*, 1996; MDLULI *et al.*, 1998b). Alguns autores sugerem que a alteração do gene *oxyR*, devido a múltiplas deleções, possam ser responsáveis pelas diferenças de sensibilidade a INH apresentada pelo *M. tuberculosis* em relação a outros gêneros bacterianos (DERETIC *et al.*, 1995; DERETIC *et al.*, 1997 e RAMASWAMY & MUSSER, 1998).

Alguns trabalhos descreveram mutações em determinados genes, que estão relacionadas com resistência a INH. Porém esses dados foram obtidos de diversos países em conjunto sendo que em algumas cepas a resistência foi gerada em laboratórios, levando a uma variação dos tipos de mutações encontradas (DERETIC *et al.*, 1995; MDLULI *et al.*, 1996; DERETIC *et al.*, 1997; MDLULI *et al.*, 1998a e RAMASWAMY & MUSSER, 1998).

Até o momento, mutações nos genes *katG*, *inhA*, *kasA* e região intergênica *oxyR-ahpC*, foram identificadas como causa de resistência a INH em *M. tuberculosis*. Entretanto as bases moleculares de resistência a INH em isolados clínicos de *M. tuberculosis* no Brasil são pouco conhecidas.

No presente trabalho propôs-se empregar a técnica de SSCP (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples) para triar mutações, nos genes relacionados com resistência a INH, em isolados clínicos de *M. tuberculosis* de origem brasileira, validar os achados pelo seqüenciamento semi-automático e estudar a relação com o teste fenotípico de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para INH. Tal resultado validará o uso destes conhecimentos para adequar métodos mais eficientes e rápidos para determinar a sensibilidade dos isolados clínicos por técnicas moleculares, cuja

execução seja simples, com custo operacional baixo e passível de ser utilizado em laboratórios de saúde pública e privada. Para isso, esses procedimentos técnicos foram testados e otimizados para cada gene relacionado com resistência a INH, e desta forma estabelecer uma relação entre o perfil de triagem com o de seqüenciamento, este último validando os procedimentos rápidos.

Neste estudo, ao avaliar a distribuição dos valores da CIM entre os isolados de *M. tuberculosis* observou-se que em 90% dos casos os resultados da CIM se concentravam em níveis elevados (acima de 4 µg/mL), sendo que em 20 (20,6%) isolados os valores eram acima de 32 µg/mL.

De forma a assegurar que os isolados utilizados neste estudo não fossem de procedência do mesmo paciente, ou relacionados, e também para caracterizá-los molecularmente como *M. tuberculosis*, realizou-se a técnica de "Spoligotyping", que se baseia na amplificação de uma região gênica altamente polimórfica denominada locus DR. Verificou-se que todos os isolados utilizados neste estudo foram caracterizados como *M. tuberculosis*, pela ausência de hibridação com os oligonucleotídeos dos espaçadores de número 33 a 36 (MOLHUIZEM *et al.*, 2000).

Entre os 157 isolados foram caracterizadas 2 cepas de *M. tuberculosis* "Beijing" que apresentaram perfil de hibridação somente com os espaçadores 35 a 43 (MOLHUIZEM *et al.*, 2000). Ao avaliar a origem dos isolados verificou-se que um tratava-se de paciente de origem oriental, e já alguns anos residentes no Brasil e estava em tratamento para tuberculose no Instituto Clemente Ferreira. A segunda cepa pertencente ao grupo Beijing não dispúnhamos do histórico.

Realizando o agrupamento pelos padrões de tipagem do "Spoligotyping" obteve-se 60 diferentes perfis para os 157 isolados, sendo que os 97 isolados resistentes apresentaram uma diversidade com 40 padrões diferentes e os sensíveis 30. Analisando o histórico de cada isolado, os resultados do seqüenciamento e os padrões de "Spoligotyping" obtidos,

podemos continuar os estudos pois estávamos certos de não estar trabalhando com isolados de mesma procedência.

5.1 Mutações no gene *katG* e resistência a INH em isolados de *M. tuberculosis*

No estudo do gene *katG* nos isolados resistentes a INH, verificou-se ausência de casos de deleção total do gene, demonstrando que tal fenômeno ocorre em baixa frequência entre as cepas brasileiras analisadas.

Embora os estudos moleculares iniciais tenham relacionado a resistência a INH com a completa deleção do gene *katG*, hoje sabe-se que este evento é raro e segundo ZHANG & YOUNG (1994), somente observado entre 10 a 20% dos isolados resistentes catalase negativas. Mutações pontuais, pequenas deleções e inserções são as causas mais frequentes de alterações da função da enzima KatG.

Estudos de FERRAZOLI *et al.* (1995) por *Southern Blot* mostraram esta baixa frequência em isolados de *M. tuberculosis* do Brasil, com um caso de deleção total do gene *katG* em 53 cepas de *M. tuberculosis* analisadas.

Uma deleção na região 3' da sequência estrutural do gene *katG* foi encontrada em um isolado resistente entre os 97 estudados no presente trabalho, que apresentava um valor para a CIM significativamente elevado ($> 32 \mu\text{g/mL}$). Esta deleção leva a tradução de uma proteína incompleta e sem função, o que justifica o alto valor da CIM encontrada para este isolado.

Nos 97 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH estudados, detectamos mutações no gene *katG* em 83 (85,6%) dos isolados. Nenhuma mutação neste gene foi observada entre os 60 isolados sensíveis a INH analisados.

A mutação no codon 315 do gene *katG* foi a alteração genética predominante, com um percentual de 61,9% dos isolados resistentes. Foram detectadas alterações nesse codon que levaram a troca do aminoácido serina

(AGC) para treonina (ACC) (50,5%), asparagina (AAC) (7,2%), isoleucina (ATC) (1%), glicina (GGC) (1%), e arginina (AGG e CGC) (2,1%). Como pode se observar, a mutação mais freqüente foi a Ser315Thr, verificada em 50,5% dos isolados resistentes.

Os resultados encontrados são concordantes com os obtidos por COCKERILL III *et al.* (1995), HEYM *et al.* (1995), MUSSER *et al.* (1996) e HAAS *et al.* (1997) que observaram que a substituição mais comum nessa região é a troca do aminoácido serina (AGC) pela treonina (ACC), mas outras substituições foram também observadas em menor porcentagem no codon 315 que levam a substituição do aminoácido serina (AGC) pela treonina (ACA), isoleucina (ATC), arginina (AGA), arginina (CGC), asparagina (AAC) ou glicina (GGC).

Foram também encontradas mais 28 mutações diferentes no gene *katG* em diferentes codons, como mutações por inserção (3), deleções (3) e mutações "missense" (22), sendo 25 mutações novas ainda não descritas na literatura em 24 (24,7%) dos isolados resistentes a INH (tabela 23).

MARTTILA *et al.* (1998) encontraram um valor porcentual bem mais alto nos isolados de origem da região de Saint Petersburg na Rússia, com mutação no codon 315 do gene *katG*. Dos 24 isolados resistentes a INH analisados e que apresentaram mutação no gene *katG*, 22 (91,7%) tinham a mutação Ser315Thr.

Discordando dos nossos achados e de outros autores acima citados PRETRORIUS *et al.* (1995) relataram que a variação no gene *katG* em isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH não é um fenômeno muito freqüente e que mutações em outras regiões do genoma do *M. tuberculosis* parecem desempenhar importância semelhante na aquisição de resistência a INH. Do mesmo modo MARTTILA *et al.* (1996) encontraram baixa freqüência de mutações no codon 315 do gene *katG*.

Segundo RAMASWAMY & MUSSER (1998) a diferença encontrada por PRETRORIUS *et al.* (1995) foi devido a problemas com a estratégia utilizada para detectar mutações no códon 315. Já a diferença encontrada por MARTTILA *et al.* (1996) não foi esclarecida, podendo ser explicada pela distinta

distribuição em diferentes áreas geográficas, que podem ser inferidas pelos resultados obtidos em nosso estudo.

Cabe salientar também que os trabalhos na literatura não correlacionaram, as mutações observadas com os valores da CIM que poderia talvez explicar o tipo de mutação encontrada com maior frequência.

O valor real de algumas mutações em outras posições do gene *katG* que não o codon 315, em causar resistência a INH em *M. tuberculosis* precisa ser esclarecido, mas de antemão podemos relacionar algumas detectadas nos isolados de *M. tuberculosis* neste estudo como: Trp91Arg, His97Arg, Ala109Val, Gly273Cys, Gly279Asp, Ser302Arg, Leu293Val e Gly299Ser com as mutações estudadas por ROUSE *et al.* (1996). Em seu estudo através de técnicas de mutações sítio direcionadas, para alterar o gene *katG* de *M. tuberculosis* sensíveis a INH que levariam as mudanças Arg104Leu, his108Gln, Asn138Ser, Leu148Arg, His270Gln, Thr270Pro, Ser315Thr, Trp321Gly e Asp381Gly, ROUSE *et al.* (1996) comprovou a responsabilidade destas mutações na aquisição de resistência a INH. RAMASWAMY & MUSSER (1998) sugerem que os aminoácidos 104 e 108 da enzima KatG estejam localizados próximo ou no sítio catalítico da enzima e os aminoácidos 270, 275 e 315 participem na ligação do grupo heme da enzima, e que mutações nestas localizações levariam a perda ou alteração da função da enzima KatG.

Os resultados do presente estudo mostram que os isolados com as mutações acima descritas apresentaram CIM para INH com valores variando de 8 a > 32 µg/mL sugerindo a provável responsabilidade destas mutações pela resistência observadas nestes isolados.

A relação da importância da atividade da enzima catalase na ação da INH, pôde ser observada também com os isolados 503, 27A, 46-S e 2542 que apresentaram inserção de adenina na posição 17, inserção de timina na posição 1311, deleção de citosina na posição 2139 e deleção de um fragmento grande de DNA na região 3' do gene *katG* respectivamente. Estas mutações levam a alteração da fase aberta de leitura do gene e interrupção no caso do isolado 2542, levando a síntese de uma proteína totalmente diferente da

enzima KatG e provavelmente sem função de ativar a INH e combater os radicais tóxicos formados pelo metabolismo micobacteriano.

Nos trabalhos iniciais utilizando ensaios moleculares, a mutação de CCG para CTG que leva a mudança de aminoácido Arg463Leu na enzima KatG foi considerada, como a mutação responsável pela resistência “in vitro” a INH em isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

Atualmente a mutação Arg463Leu é considerada como um polimorfismo genético, pois foi encontrada esta mesma alteração em isolados de *M. tuberculosis* sensíveis a INH. Apenas um isolado em nosso estudo (3408/00), que era procedente de paciente atendido no Instituto Clemente Ferreira - cidade de São Paulo, apresentou a mutação Arg463Leu. O isolado apresentava o genótipo característico do grupo “Beijing”, pela técnica de “Spoligotyping”, semelhante ao isolado 3401/00 que foi obtido de paciente imigrante da China e residente a alguns anos no Brasil. *M. tuberculosis* com características “Beijing” e mutação Arg463Leu tem sido isoladas com certa frequência nas regiões do leste asiático, e vem sendo relacionada com resistência a múltiplos fármacos.

O achado do genótipo Arg463Leu (1%) entre os isolados resistentes e nenhum entre os sensíveis em nosso estudo, mostra um baixo índice desta mutação em nosso país. Salienta-se, porém que para uma melhor determinação dessa porcentagem, uma análise desta mutação em isolados de outras regiões do Brasil deva ser considerada.

Dados concordantes foram obtidos por MUSSER (1997), que analisando isolados de *M. tuberculosis* procedentes do México, Honduras, Guatemala, Peru e vários outros países da América Latina encontraram acima de 85% dos microrganismos com arginina no resíduo 463 da proteína ao invés de leucina.

Desta forma VAN DOORN *et al.* (2000) consideram que por este polimorfismo não estar relacionado com a pressão seletiva pelo tratamento com INH, podem estar superestimadas a nível mundial as porcentagens dos isolados, com resistência a INH, que foram atribuídos as mutações no gene *katG*.

No presente trabalho, a ausência ou a presença da mutação Arg463Leu não alterou o percentual de mutações atribuído ao gene *katG* nos isolados resistentes de origem brasileira devido ao baixo número de isolados com esta mutação e a presença concomitante de mutação no codon 315 neste isolado.

Já no caso de mutações no codon 315 do gene *katG* parece haver uma variação deste percentual entre diferentes regiões geográficas analisadas. Na Rússia (MARTTILA *et al.*, 1998 e MOKROUSOV *et al.*, 2002b) foi observado um alto número de isolados resistentes a INH com a mutação Ser315Thr, em relação aos 61,9% que foi encontrada no presente estudo com isolados de *M. tuberculosis* de origem brasileira, 65% por HAAS *et al.* (1997) e 58% por MUSSER *et al.* (1996).

5.2 Mutações na região promotora e estrutural do gene *inhA* e resistência a INH em isolados de *M. tuberculosis*

O gene *inhA* tem sido relacionado com resistência de *M. tuberculosis* a INH e a ETH que é um fármaco estruturalmente relacionado com a INH. Neste gene a região promotora e alguns codons da região estrutural do gene parecem serem alvos de alterações gênicas que induzem resistência a INH.

Os resultados do presente estudo mostram somente dois diferentes tipos de mutações na região promotora do gene *inhA* em 25 (25,8%) dos isolados resistentes a INH. Vinte e três isolados apresentaram a mudança de C para T na posição -15 e dois de G para T na posição -17. Um fato que chamou a atenção para o valor das técnicas moleculares no diagnóstico de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH foi de que um dos isolados com mutação na posição - 15 do gene *inhA* foi recebido, durante a coleta dos isolados, como sendo uma cepa sensível a INH e sendo incluída no grupo controle de isolados sensíveis, porém durante a triagem por PCR-SSCP esta mutação foi detectada. Este isolado apresentou, no entanto, uma CIM de 2 µg/mL em nosso estudo, sendo classificada novamente como resistente, reforçando a não existência

desta mutação em isolados de *M. tuberculosis* sensíveis a INH (BANERJEE *et al.*, 1994; BASSO *et al.*, 1998; DESSEN *et al.*, 1995; KAPUR *et al.*, 1995 e ROZWARSKI *et al.*, 1998).

A região estrutural do gene *inhA* não foi analisada em toda a sua extensão. Os iniciadores utilizados para detecção de mutações nesta região pela técnica de PCR-SSCP empregada neste estudo foram escolhidos com finalidade de detectar mutações já descritas na literatura e localizadas nos códons 16, 21, 47, 78, 94 e 95 da região estrutural deste gene (ROZWARSKI *et al.*, 1998; FANG *et al.*, 1999 e ZHANG & TELENTI, 2000).

Entre os isolados resistentes a INH detectamos mutações somente nos códons 21 e 44 na região estrutural do gene *inhA* em 6 (6,2%) isolados. Quando consideramos o efeito dessas mutações, determinadas pelo seqüenciamento, na mudança de aminoácido na proteína, esta porcentagem é reduzida para 5,2%, pois a mutação no códon 44 que leva a troca de CTG para TTG é silenciosa, não acarretando mudança de aminoácido na seqüência protéica (Leu44Leu).

Dentre as cinco mutações detectadas no codon 21 no gene *inhA*, 4 levam a troca de ATC para ACC e 1 de ATC para GTC, conferindo mudança de aminoácido Ile21Thr e Ile21Val respectivamente na enzima InhA.

Através de estudos bioquímicos de BASSO *et al.* (1998) determinando a cinética da inativação da enzima InhA nos mutante Ile21Val e Ile95Pro, pela INH ativada, tornou-se claro o real valor destas mutações em induzir resistência a INH em *M. tuberculosis*.

Pode-se então inferir que a mutação Ile21Thr encontrada nos isolados deste estudo e que já foi referida na literatura (ZHANG & TELENTI, 2000) possa apresentar o mesmo efeito em relação a resistência a INH.

Embora FANG *et al.* (1999) e ZHANG & TELENTI (2000) tenham relacionado a presença de mutações nos códons 94 e 95 do gene *inhA* com resistência a INH, o que levou o estímulo de selecionar os iniciadores visando amplificar pela PCR essa região do gene para detecção de mutações, neste estudo, não se encontrou entre os isolados resistentes e sensíveis nenhuma das duas mutações citadas.

ROZWARSKI *et al.* (1998) relataram que aproximadamente 25% dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH apresentam mutações na região promotora e/ou estrutural do gene *inhA* e nenhuma mutação nestas regiões foi identificada em isolados sensíveis.

Considerando que no presente estudo 26,8% dos isolados resistentes a INH tinham mutação no gene *inhA* e nenhuma mutação foi encontrada entre um número expressivo de isolados sensíveis a INH, os nossos achados reforçam os relatos de ROZWARSKI *et al.* (1998).

5.3 Mutações na região intergênica *oxyR-ahpC* e resistência a INH em isolados de *M. tuberculosis*

Através dos trabalhos iniciais de SHERMAN *et al.* (1996) e de WILSON & COLLINS (1996) surgiram evidências da participação da proteína AhpC, codificada pelo gene *ahpC*, com atividade de combater os peróxidos orgânicos, semelhante a atividade de peroxidase da enzima KatG, na indução de resistência a INH. Estes estudos e outros realizados pelo seqüenciamento da região intergênica *oxyR-ahpC*, onde está localizado uma provável região regulatória destes genes, sugerem que mutações que podem levar a expressão aumentada da enzima AhpC teria elevada importância na indução de resistência a INH em isolados de *M. tuberculosis* (KELLEY *et al.* 1997; SREEVATSAN *et al.*, 1997).

Entre os isolados resistentes, estudados no presente trabalho, somente 10 (10,3%) apresentaram mutações nessa região, o que nos leva a pensar que estas mutações parecem interferirem de forma pouco significativa na indução de resistência a INH. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por SREEVATSAN *et al.* (1997) com respeito a baixa frequência de mutações na região intergênica *oxyR-ahpC* em isolados resistentes a INH. Por outro lado SHERMAN *et al.* (1996) relataram a ocorrência de uma proporção alta de mutações nesta região em isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH.

Sugere-se atualmente que a expressão aumentada da proteína AhpC, devido a mutações na região promotora do gene *ahpC*, por si, não é responsável pela indução de resistência a INH, e sim, um mecanismo compensatório devido a ausência da enzima KatG ou perda parcial de sua função (RATTAN *et al.*, 1998). Explica-se tal fato pelo paradoxo de algumas cepas de *M. tuberculosis* apesar de não apresentarem atividade de catalase possam sobreviver dentro dos macrófagos do hospedeiro. Sabe-se que a habilidade do *M. tuberculosis* de se adaptar a perda da função da enzima KatG e combater radicais peróxidos é marcante, então supõem-se que a expressão aumentada de enzima AhpC, que é expressa de forma constitutiva nesse microrganismo, viria suprir a deficiência da enzima KatG em combater o estresse oxidativo (RAMASWAMY & MUSSER, 1998, RATTAN *et al.*, 1998 e WILSON *et al.*, 1998).

Analizando o conjunto das mutações encontradas no gene *katG* e região intergênica *oxyR-ahpC* em isolados de *M. tuberculosis* resistentes no presente estudo pode-se inferir que mutações no codon 315 não parece interferir de forma significativa na atividade de peroxidase da enzima KatG como também observado por ROUSE *et al.* (1996) e sugerido por SREEVATSAN *et al.* (1997), pois todos os isolados que apresentaram esta mutação no gene *katG* (61,9%) no presente estudo não apresentaram mutação na região intergênica *oxyR-ahpC*.

Do total de 24 (24,7%) isolados resistentes com mutação em outros códons que não o 315 no gene *katG*, 9 (9,3%) apresentaram mutações na região intergênica *oxyR-ahpC*, incluindo uma mutação ainda não descrita na literatura, com a mudança de G para A na posição – 48 em relação ao sítio de início da transcrição (mRNA) do gene *ahpC*. Os 15 isolados clínicos restantes não apresentaram mutação na região intergênica *oxyR-ahpC*, embora apresentassem mutações no gene *katG* que sabidamente interferem com a atividade da enzima KatG, como a inserção de uma adenina na posição 17 do DNA do isolado 503 que leva a alteração da fase aberta de leitura do gene. Esta inserção resulta na alteração da leitura do código genético acarretando a síntese de uma proteína diferente da katG. Neste caso, supõe-se que outro ou

outros genes estejam envolvidos e que expressariam outras enzimas com capacidade de detoxificar peróxidos orgânicos como é o caso das enzimas *katG* e *AhpC*, uma vez que provavelmente devido a mutações a enzima *katG* estaria com suas atividades comprometidas.

É estimulante no estudo de mecanismos moleculares envolvidos com resistência a INH encontrar novos desafios como o isolado de número 4509 que apresentou mutação somente na região intergênica *oxyR-ahpC* na posição – 39, sem contudo apresentar qualquer outra mutação no gene *katG*, confirmado pelo seqüenciamento completo desse gene ou em outros genes analisados no presente estudo.

O valor de mutação compensatória na posição – 39 da região intergênica *oxyR-ahpC* em isolados com resistência a INH atribuído por SREEVATSAN *et al.* (1997), pode ser observado em 3 dos isolados resistentes que apresentaram também mutação no gene *katG*. Exemplo do ocorrido é o isolado 2542 que apresentou deleção de um fragmento grande na região 3' do gene *katG*. Como já citado anteriormente a deleção de um grande fragmento do gene levará a expressão de uma proteína sem atividade enzimática o que pode explicar o alto valor da CIM apresentado por este isolado, porém não explica o alto valor obtido no caso do isolado 4509 que foi >32 µg/mL e que não apresentou mutação no gene *katG*, o que nos leva a pensar o real valor compensatório de mutações na região intergênica *oxyR-ahpC*. Neste caso uma provável explicação seria encontrada caso a região promotora do gene *katG* fosse analisada quanto a presença de mutações e a atividade da enzima *katG* fosse quantificada.

5.4 Mutações no gene *kasA* e resistência a INH em isolados de *M. tuberculosis*

Considerando que o principal mecanismo de ação da INH ocorre pela interferência na síntese de ácidos micólicos, MDLULI *et al.* (1998a) sugeriram

que a presença de mutações no gene *kasA*, possa induzir resistência a INH em *M. tuberculosis*.

O gene *kasA* faz parte de um operon composto por cinco genes que são transcritos na mesma direção e codifica uma enzima com importante função na elongação da principal cadeia carbônica dos ácidos micólicos.

Os achados de MDLULI *et al.* (1998a) trouxeram grande expectativa supondo-se ter descoberto mais um provável mecanismo pelo qual o *M. tuberculosis* poderia tornar-se resistente a INH. Quatro diferentes mutações foram descritas neste gene em isolados resistentes, Asp66Asn, Gly269Ser, Gly312Ser e Phe413Leu e nenhuma mutação foi observada em 43 isolados sensíveis.

Uma análise semelhante em relação ao gene *kasA* foi realizada por LEE *et al.* (1999) com isolados de Singapura onde foi observado mutação no gene *kasA* tanto em isolados sensíveis como em resistentes. Neste estudo a mutação encontrada tanto em isolados sensíveis como em resistentes a INH foi a mudança de GGC para AGC levando a alteração do aminoácido Gly312Ser, e as mutações que levam a troca de AGG para AAG, GGT para AGT e de GGC para GAC acarretando a mudança dos aminoácidos Arg121Lys, Gly269Ser e Gly387Asp respectivamente, somente em isolados resistentes a INH.

A real importância de mutações no gene *kasA* em induzir resistência a INH em *M. tuberculosis* ainda não está clara. Neste estudo o gene *kasA* foi analisado, pela técnica de PCR-SSCP e seqüenciamento semi-automático, em toda a sua extensão, em isolados sensíveis e resistentes a INH em busca de mutações. Os resultados encontrados foram discrepantes dos obtidos por MDLULI *et al.* (1998a) e LEE *et al.* (1999), onde a mutação mais encontrada foi a troca de GGT para AGT acarretando mudança do aminoácido Gly269Ser na enzima KasA, tanto em isolados resistentes (12,4%) como em sensíveis (16,7%).

A possibilidade desta alteração do aminoácido 269 da enzima KasA estar relacionada com resistência a INH nos isolados avaliados no presente estudo, parece ser muito pequena, ou nula, pois os isolados com resistência a INH que apresentaram esta mutação também apresentaram mutações em

outros genes como *katG* e *inhA* que justifica o valor da CIM obtido. Um segundo fator que sugere a não participação desta mutação na resistência a INH foi o alto número de isolados sensíveis a INH (16,7%) neste estudo, que apresentaram esta mutação.

Analisando o gene *kasA*, em toda a sua extensão, foi observado também, três outras diferentes mutações silenciosas em isolados sensíveis, que levou a troca de GGT para GGC, CAC para CAT e GGC para GGA, nos códons 149, 180 e 318 respectivamente, sem contudo mudar os aminoácidos da enzima KasA. A mutação no codon 149 foi detectada em um isolado que também apresentava mutação no codon 269.

A luz dessas poucas informações a respeito do provável envolvimento de mutações no gene *kasA* com a resistência a INH em isolados de *M. tuberculosis*, avaliou-se que o dado deve ser melhor estudado e explorado, devido ao pequeno número de isolados estudados. Além de que, a região promotora deste gene e de outros genes que fazem parte do *operon kas* como os genes *acpM* e *kasB* não foram estudados, tanto no presente estudo como por MDLULI *et al.* (1998a) e LEE *et al.* (1999).

5.5 Outros mecanismos moleculares envolvidos na resistência a INH em isolados de *M. tuberculosis*

Apesar dos trabalhos realizados para desvendar as bases moleculares de resistência a INH desenvolvida pelas cepas de *M. tuberculosis*, uma pequena porcentagem ou seja em torno de 10% não apresentaram mutações em nenhum dos genes relacionados com resistência a INH conhecidos até o momento, que possam explicar esta resistência, algumas inclusive com CIM > 50µg/mL (TELENTI, 1998).

No presente estudo após a triagem de presença de mutações nos genes *katG*, *inhA*, *kasA* e região intergênica *oxyR-ahpC* encontrou-se somente 4 isolados (4,1%) que não apresentaram mutações que pudessem ser responsabilizadas pela resistência apresentada por estes isolados, resultado

esse bem inferior ao apresentado na literatura (TELENTI, 1998). Deste, 2 (2,1%) isolados não apresentaram nenhuma mutação nos genes estudados no presente trabalho, 1 (1%) apresentou mutação no codon 269 (Gly269Ser) no gene *kasA* e 1 (1%) na posição -39 da região intergênica *oxyR-ahpC* que leva a substituição de C para T.

5.6 Correlação dos valores da CIM apresentada pelos isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH com as mutações encontradas pelo seqüenciamento semi-automático

Na tentativa de estabelecer uma relação entre variedade de mutações já descritas no gene *katG* e os valores da CIM para INH, HEYM *et al.* (1999) sugeriram que mutações nas proximidades da região N-terminal da proteína KatG, como Ser315 e Thr275, e que supostamente, apresentam o sítio ativo e o sítio de ligação do co-fator heme respectivamente, estariam relacionadas com valores altos de CIM para INH. Já mutações na parte C-terminal da proteína, como Arg463Leu, que não estariam implicadas com a atividade da catálise bem como da ligação do heme, resultariam em baixos valores de CIM, ou não acarretariam resistência a INH.

Os isolados que apresentaram mutação no codon 315 do gene *katG* no presente estudo, apresentaram um valor de CIM variando de 4 a > 32µg/mL. Torna-se difícil neste caso em particular, estabelecer uma correlação direta entre o valor da CIM para INH e a diferença de aminoácidos encontrada na proteína KatG devido a mutações no codon 315 e mesmo em outras regiões do gene *katG*, considerando que outros fatores como a variação de permeabilidade da parede celular ou associações de mutações em outros genes como *inhA* ou outro ainda não conhecido até o momento, podem apresentar efeitos aditivos no valor da CIM para INH em *M. tuberculosis*.

Com relação ao valor da CIM para INH em isolados com mutação somente no gene *inhA*, podemos observar que os isolados com mutação somente na região promotora deste gene apresentou um valor para a CIM

variando de 1 a 2 $\mu\text{g/mL}$, como observado por VAN SOOLINGEN *et al.* (2000) e ZHANG & TELENTI (2000). Isto nos leva a pensar que aumentando a dose de INH para o tratamento nesses casos, conseguiríamos eliminar este tipo de resistência. Porém, devemos lembrar que o mecanismo que induz resistência a INH em *M. tuberculosis* não está totalmente entendido e a provável ocorrência de efeitos aditivos de mutações em diferentes genes, alguns ainda não conhecidos, no valor da CIM para INH, supostamente pode ocorrer. Os isolados 28A, 463 e 2130/00 que apresentaram mutações na região promotora do gene *inhA* e valores de CIM de 4, 8 e 32 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, para INH, provavelmente devem apresentar mutações em outros genes ainda não relacionados com resistência a INH, ou mesmo no gene *katG*. Sugere-se a probabilidade de mutações no gene *katG* nos isolados 28A e 2130/00 uma vez que nestes isolados este gene não foi seqüenciado em toda a sua extensão e a presença de mutações nesse gene poderia explicar os altos valores da CIM encontrado para INH.

Apesar do pequeno número de isolados que apresentaram mutação conjunta na região promotora e região estrutural do gene *inhA*, salienta-se a possibilidade de poder ocorrer um efeito aditivo no valor da CIM neste caso em particular. Esta hipótese se deve aos resultados obtidos com os isolados 64A e 3614/00 que apresentaram valor de CIM de 16 e $> 32 \mu\text{g/mL}$ respectivamente e tiveram o gene *katG* completamente seqüenciado e não foi encontrada qualquer mutação, bem como nos outros genes analisados no presente estudo. Outros dois isolados resistentes a INH (30A e 803/01) com altos valores de CIM (8 e 16 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram mutações somente nas regiões promotora e estrutural do gene *inhA*. Nestes dois casos supõem-se também a ocorrência do efeito aditivo das mutações nos valores da CIM para INH, embora o gene *katG* não tenha sido seqüenciado em toda a sua extensão.

No entanto para uma melhor análise, estudos moleculares mais detalhados sobre importância destas mutações na questão de efeito aditivo para o valor da CIM para INH são necessários para qualquer proposta.

Partindo do princípio de que o processo de desenvolvimento de resistência a INH é multifatorial, que mais de um gene podem estar envolvidos (FERRAZOLI *et al.*, 1995) e a difícil correlação com os valores da CIM entre os isolados estudados que apresentaram mutação em um único gene, supõe-se que, outros mecanismos desconhecidos até o momento, estão envolvidos e em muitos casos em associação com os já descritos, levando a somatória de causas e aumento no valor da CIM. Uma vez conhecidos todos os mecanismos que induzem resistência a INH em *M. tuberculosis* e ação no valor da CIM para INH, pode-se avaliar com maior segurança a questão do aumento da dose terapêutica para o tratamento de pacientes com tuberculose por cepas que apresentam mutações somente na região promotora do gene *inhA*.

5.7 Avaliação da sensibilidade da técnica de PCR-SSCP empregada para triagem de mutações em genes relacionados com resistência a INH em *M. tuberculosis*

Outro aspecto que foi analisado no presente trabalho foi a concordância dos resultados obtidos com a técnica de PCR-SSCP otimizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF – USP, utilizando gel de poliacrilamida GeneGel Excel (Amersham Biosciences), para triagem de mutações em genes relacionados com resistência a INH em *M. tuberculosis*, comparando com o seqüenciamento semi-automático.

A técnica de PCR-SSCP baseia-se na diferença de mobilidade eletroforética que é dependente da seqüência nucleotídica de fitas simples de DNA em gel de poliacrilamida não desnaturante (PINHEIRO *et al.*, 1999).

Esta metodologia foi muito usada nos estudos moleculares iniciais para triagem de mutações em genes relacionados com resistência a INH e outros fármacos em *M. tuberculosis* (COOKSEY *et al.*, 1996b). Existem diferentes protocolos para realização da técnica de SSCP, com o objetivo de realizar a detecção de mutações. Neste sentido procurou-se usar um protocolo de realização fácil e rápida, com boa sensibilidade na detecção de mutações.

Para a otimização da técnica de SSCP alguns fatores como temperatura e tamanho do produto da PCR foram observados para a manutenção de ótimas condições para detecção de mutações (NOLLAU & WAGENER 1997).

A metodologia, otimizada no presente trabalho, para triagem de mutações em genes relacionados com resistência a INH em *M. tuberculosis* demonstrou excelente concordância com os resultados obtidos pelo seqüenciamento semi-automático.

Comparando os resultados obtidos pela realização da triagem de mutações no codon 315 do gene *katG*, utilizando a metodologia de PCR-SSCP, com o resultado do seqüenciamento, encontrou-se uma concordância de 100%. Além disso, a técnica de PCR-SSCP apresentou perfis de migração das fitas simples de DNA, no gel de poliacrilamida, diferente dependendo da troca de base nucleotídica ocorrida devido a mutação. A comparação dos perfis de migração das fitas simples de DNA deixou evidente que a mudança de diferentes bases nucleotídicas, embora no mesmo codon, leva a presença de diferentes perfis de migração das fitas simples de DNA.

Nenhum resultado falso positivo ou falso negativo, na triagem de mutações pela PCR-SSCP, foi observada em relação a análise de mutação no codon 315 do gene *katG* pelo seqüenciamento. Esta análise pôde ser realizada considerando que alguns isolados mesmo sem apresentar perfil de PCR-SSCP, diferente do apresentado pela cepa padrão H37Rv, foram também seqüenciado e não foi encontrada mutação nesta região.

Analogia semelhante pode ser realizada em relação à triagem de mutações na região promotora do gene *inhA*. A porcentagem de concordância da técnica de PCR-SSCP e o seqüenciamento apresentaram um valor de 100%. Neste gel de poliacrilamida pôde-se observar dois diferentes perfis de migração das fitas simples de DNA obtidas pela PCR-SSCP e que pelo seqüenciamento observou ser a troca de C para T e de G para T nas posições -15 e -17 respectivamente.

No caso da região estrutural do gene *inhA*, a concordância entre o resultado da técnica de PCR-SSCP e o seqüenciamento tanto para a região

adjacente ao codon 16 quanto para o codon 94 também foi de 100%. Foram detectadas duas mutações diferentes no codon 21 que levaram a mudança de ATC para ACC e ATC para CTC com diferentes perfis de migração das fitas simples de DNA no gel de poliacrilamida.

Pode-se atribuir este porcentual de concordância para estas duas regiões (16 e 94) em conjunto, pois o seqüenciamento de todos os isolados com perfil de mutação na região adjacente ao codon 16 do gene foi realizado utilizando-se os iniciadores inhA 5 e inhA 6, que abrangia também a região adjacente ao codon 94 do gene.

No seqüenciamento de um dos isolados resistentes que apresentou perfil de PCR-SSCP diferente do apresentado pelo padrão sensível H37Rv, observou-se que a mutação apresentada no codon 44 levou a troca de CTG para TTG, porém esta alteração não leva a mudança do aminoácido (Leu44Leu) na seqüência protéica.

Este resultado poderia ser considerado como falso positivo pela técnica de PCR-SSCP em detectar isolados de *M. tuberculosis* resistente a INH, pois esta mutação é silenciosa não acarretando alteração do aminoácido na proteína e conseqüentemente não levando a alteração de sua função. No entanto, este isolado apresentou também mutações nos genes *katG* e regiões promotoras de *inhA* e *ahpC*, justificando sua resistência a INH o que não altera os valores porcentuais de detecção de isolados resistentes pois 5 regiões gênicas foram avaliadas ao mesmo tempo.

Análise neste mesmo sentido realizada para a região intergênica *oxyR-ahpC* apresentou 100% de concordância da técnica de PCR-SSCP com os resultados do seqüenciamento. Neste caso, também pôde-se observar que cada mudança de base nucleotídica em diferentes posições da região amplificada pela PCR apresentou perfil de migração das fitas simples de DNA diferentes entre si. Porém, nesta região foram detectados perfis de PCR-SSCP de mutante em 5 isolados de *M. tuberculosis* (1 resistente e 4 sensíveis a INH) que após o seqüenciamento verificou serem de mutações silenciosas e estarem localizadas na seqüência estrutural do gene *ahpC*. A especificidade da técnica de PCR-SSCP em detectar mutações nessa região gênica em

particular pode ser melhorada utilizando iniciadores ajustados para amplificar um fragmento menor desta região, e que inclua somente a região intergênica *oxyR-ahpC*.

Todos os isolados que apresentaram perfil de mutante pela técnica de PCR-SSCP em qualquer um dos seis fragmentos do gene *kasA* estudado foram seqüenciados e nenhum falso positivo ou falso negativo em detectar mutações foi observado. Esta análise comparativa pode ser realizada considerando que vários isolados mesmo apresentando perfil de PCR-SSCP semelhante ao do padrão H37Rv ou seja com perfil de não mutante, foram também seqüenciados para fazer a correlação entre PCR-SSCP e seqüenciamento

A eficiência da técnica de PCR-SSCP para detectar mutações, utilizada no presente trabalho, pôde também ser avaliada de forma comparativa com a técnica da determinação da CIM segundo metodologia padronizada por COLLINS & FRANZBLAU (1997) utilizando o corante Alamar Blue como agente revelador de crescimento micobacteriano.

Neste caso para fazer uma análise que pudesse ser comparativa entre a CIM para INH e a triagem de mutações em genes relacionados com resistência a INH pela técnica de PCR-SSCP e confirmadas pelo seqüenciamento, foi realizada uma associação dos PCR-SSCPs que detectaram mutações nos genes *katG*, *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC*. No total desta somatória, foram computadas as mutações no codon 315 do gene *katG*, regiões promotora e adjacentes aos codons 16 e 94 do gene *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC*.

Partindo do princípio que somente a presença de mutações nestas regiões em conjunto, foram comparadas ao valor da CIM, podemos observar uma alta porcentagem (90,7%) de detecção de resistência nos isolados de *M. tuberculosis* pela técnica de PCR-SSCP.

O percentual de 9,3% de isolados resistentes a INH que apresentaram perfil de PCR-SSCP semelhante ao da cepa padrão H37Rv e com um valor de CIM > 0,5 µg/mL incluem os isolados que não apresentaram mutação nas regiões amplificadas pelos iniciadores utilizados para a realização

da PCR-SSCP, com o objetivo de detectar mutações na região adjacente ao codon 315 do gene *katG*, mas apresentaram mutações em outras posições desse gene. As mutações em outras posições desse gene somente foram detectadas quando da realização do seqüenciamento do gene em toda a sua extensão, o que é extremamente laborioso e de custo elevado. Cabe também neste porcentual a inclusão de 3 (3,1%) isolados que não apresentaram mutações em nenhuma das regiões gênicas analisadas (*katG* inteiro, região promotora e estrutural do gene *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC*).

A metodologia de PCR-SSCP otimizada neste trabalho permite a realização de uma rápida detecção de resistência a INH em *M. tuberculosis* utilizando-se PCR para 5 regiões gênicas mais freqüentes em apresentar mutações que são, até então, sugeridas em induzir resistência a INH em *M. tuberculosis*. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que em um único gel de poliacrilamida, pode-se adaptar as mesmas condições de voltagem, temperatura e tempo de procedimento da técnica de SSCP para a detecção de mutações nestas 5 regiões gênicas em *M. tuberculosis*.

Através dos resultados apresentados no presente estudo, pôde-se verificar que 90,7% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH tinham mutações na região do codon 315 do gene *katG* e/ou na região promotora e adjacentes aos codons 16 e 94 do gene *inhA* e/ou na região intergênica *oxyR-ahpC*.

A triagem de mutações, relacionadas com resistência a INH em isolados de *M. tuberculosis*, por PCR-SSCP pode ser feita de forma rápida (24 – 48 horas), quando se tem o microrganismo em cultivo. Além disso, a metodologia de PCR-SSCP apresenta a vantagem da facilidade de manipulação dos géis de poliacrilamida e de tampões, tempo de realização da técnica e leitura que pode ser feita visualmente após coloração pela prata não precisando equipamentos sofisticados. Estes, são parâmetros responsáveis para sugerir a utilização da técnica de PCR-SSCP, analisando as 5 regiões gênicas estudadas no presente trabalho, que estão envolvidas na resistência a INH, como técnica de escolha para detecção de isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH, principalmente em centros onde o índice de resistência é

alto. Nestes centros, a rápida detecção destes isolados viria contribuir de forma significativa para a quebra da cadeia de transmissão de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH e mais grave ainda, cepas com resistência a múltiplos fármacos. Devido aos benefícios trazidos pelo diagnóstico e determinação da presença de cepas resistentes em tempo hábil, o custo de implantação desta metodologia, nestes centros, torna-se irrisório sendo suplantado pelos benefícios obtidos na epidemiologia da tuberculose resistente.

O mapeamento de mutações em genes de conhecido envolvimento com a resistência aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose apresenta inestimável valor para o desenvolvimento de novas formulações de medicamentos para o tratamento da tuberculose. Uma vez conhecido o mecanismo molecular da resistência a INH, novos fármacos poderão ser sintetizados e utilizados de forma eficiente no tratamento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH

A detecção de 28 novos tipos de mutação, neste estudo, indica a importância de um trabalho sistemático com a associação de métodos fenotípicos e genotípicos para detecção de mutantes resistentes a INH nos isolados de *M. tuberculosis*.

É importante ressaltar que esta linha de pesquisa deve continuar com novos trabalhos, pois muitas questões a respeito do mecanismo de resistência a INH permanecem obscuras. Com o avanço nos estudos moleculares e conhecimento das bases moleculares responsáveis pela resistência do *M. tuberculosis* aos principais fármacos empregados no tratamento, espera-se que em futuro próximo, estas técnicas possam ser aplicadas para esclarecer casos de resistência na tuberculose brasileira.

6. CONCLUSÕES

- A metodologia de PCR-SSCP, otimizada no presente trabalho, permitiu a detecção de alterações nos genes *katG*, *inhA*, *kasA* e região intergênica *oxyR-ahpC*, apresentando boa sensibilidade e concordância com a técnica de seqüenciamento, em isolados clínicos de *M. tuberculosis* de origem brasileira.
- A metodologia de PCR-SSCP, otimizada no presente trabalho, por ser de realização fácil e rápida e apresentar boa sensibilidade para detectar mutações, pode ser aplicada em laboratórios clínicos para a determinação de resistência a INH em *M. tuberculosis*.
- As bases genéticas da resistência a INH nos isolados clínicos de *M. tuberculosis* de origem brasileira está associada principalmente com alterações no gene *katG*, porém um pequeno número de isolados também apresentam alterações no gene *inhA* e região intergênica *oxyR-ahpC*.
- Considerável número de mutações detectadas no gene *katG*, ainda não descritas na literatura, podem estar relacionadas com a resistência a INH nos isolados de *M. tuberculosis* de origem brasileira.

- Mutações no gene *kasA* foram identificadas tanto em isolados de *M. tuberculosis* resistentes quanto em sensíveis a INH de origem brasileira, não sendo encontrada associação entre estas mutações e o perfil de resistência apresentado pelos isolados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BANERJEE, A.; DUBNAL, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, 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**, Washington – D.C., v.263, p.227-230, 1994.

BANERJEE, A.; SUGANTINO, M.; SACCHETTINI, J. C.; JACOBS, W. R. The *mabA* gene from the *inhA* operon of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3-ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance. **Microbiology**, London, v.144, p.2697-2707, 1998.

BARDOU, F.; RAYNAUD, C.; RAMOS, C.; LANÉELE, M.A.; LANÉELE, G. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, London, v.144, p.2539-2544. 1998.

BARRERA, L. Acerca de la resistencia de las micobacterias a los antibióticos, un enfoque microbiológico. **Infect. & Microbiol. Clín**, Buenos Aires, v.6, p.192-98, 1994.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. CENTRO DE REFERÊNCIA PROF. HELIO FRAGA. Manual de bacteriologia da tuberculose. 2ª Ed. Rio de Janeiro, 1984. 115p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE PROGRAMAS ESPECIAIS DE SAÚDE. DIVISÃO DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA. CAMPANHA NACIONAL CONTRA A TUBERCULOSE. **Controle da tuberculose: Uma proposta de integração ensino-serviço**. 3ª Ed. Rio de Janeiro, 1992. 155p.

CANETTI, G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v.92, p.687, 1995.

CANETTI, G.; RIST, N.; GROSSET, J. Mésure de la sensibilité du bacilli tuberculeux aux drogues antibacilares par la méthode des proportions. **Rev. Tuberc. Pneumol.**, Paris, v.27, p.217, 1963.

Centro de Vigilância Epidemiológica - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Tuberculose - Informações diversas, tabelas e série histórica. [on line]. Available: <http://www.cve.saude.sp.gov.br> [28/09/02].

CHEN, P.; BISHAI, W. R. Novel selection for Isoniazid (INH) resistance genes supports a role for NAD⁺ - binding proteins in mycobacterial INH resistance. **Infect. Immun.**, Washington - D.C., v.66, n.11, p.5099-5106, 1998.

COCKERILL III, 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 *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (*katG*) gene associated with isoniazid resistance. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.171, p.240-245, 1995

COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington - D.C., v.41, n.5, p.1004-1009, 1997.

COOKSEY, R. C.; CRAWFORD, J. T.; JACOBS, W. R.; SHINNICK, T. M. A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of *Mycobacterium tuberculosis* expressing firefly luciferase. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington - D.C., v.37, n.6, p.1348-1352, 1996a.

COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G. P.; McQUEEN, A.; GLICKMAN, S. E.; CRAWFORD, J. T. Characterization of Streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington - D.C., v.40, n.5, p.1186-1188, 1996b.

COOKSEY, R. C.; HOLLOWAY, B. P.; OLDENBURG, M. C.; LISTENBEE, S.; MILLER, C. W. Evaluation of the invader assay, a linear signal amplification method, for identification of mutations associated with resistance to rifanpin and isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington - D.C., v.44, n.5, p. 1296-1301, 2000.

COHN, D.L.; BUSTREO, F.; RAVIGLIONE, M. C. Drug-Resistant Tuberculosis: Review of the Worldwide Situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. **Clin. Infect. Dis.** Chicago, v.24, p. 121-130, 1997.

DERETIC, V.; PHILIPP, W.; DHANDAYUTHAPANI, S.; MUDD, M. H.; CURCIC, R.; GARBE, T.; HEYM, B.; VIA, L. E.; COLE, T. *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: Implications for sensitivity to isoniazid. **Mol. Microbiol.**, Orlando, v.17, n.5, p.889-900, 1995.

DERETIC, V.; SONG, J.; PAGÁN-RAMOS, E. Loss of oxyR in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, v.5, n.9, p.367-372, 1997.

DESSEN, A.; QUEMARD, A.; BLANCHARD, J. S.; JACOBS, W. R.; SACCHETTINI, J. C. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, Washington – D.C., v.267, p.1638-1641, 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* by peroxides in *Mycobacterium smegmatis* and lack of expression in *M. aurum* and *M. tuberculosis*. **J. Bacteriol.**, Washington – D.C., v.178, n.12, p.3641-3649, 1996.

DUTT, A. K. & STEAD, W. W. Epidemiology and host factors. In: Schlossberg, D. **Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections.**, 4th Ed, W.B. Saunders company, Philadelphia. 1999. p.3-16.

ESPINAL, M. A.; LASERSON, K.; CAMACHO, M.; FUSHENG, Z.; KIM, S. J.; TLALI, E.; SMITH, I.; SUAREZ, P.; ANTUNES, M. L.; GEORGE, A. G.; MARTIN-CASABONA, N.; SIMELANE, P.; WEYER, K.; BINKIN, N.; RAVIGLIONE, M. C. Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* v.5, n.10, p. 887 – 893, 2001.

FANG, Z.; DOIG, C.; RAYNER, A.; KENNA, D. T.; WATT, B.; FORBES, K. J. Molecular evidence for heterogeneity of the multiple-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* population in Scotland (1990 to 1997). *J. Clin. Microbiol.*, Washington – D.C., v.37, n.4, p.998-1003, 1999.

FÄTKENHEUER, G.; Taelman, H.; LEPAGE, P.; SCHWENK, A.; WENZEL, R. The return of Tuberculosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, New York, v.34, p.139-146, 1999.

FERRAZOLI, L.; PALACI, M.; TELLES, M. A. S.; UEKI, S. Y.; KRITISKI, A. L.; MARQUES, L. R. M.; FERREIRA, O. C.; RILEY, L. W. - Catalase expression, KatG and MIC of isoniazid for *Mycobacterium tuberculosis* from São Paulo, Brazil. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.173, p.237-240, 1995.

FIÚZA DE MELO, F. A.; IDE NETO, J.; SEICENTO, M.; PINTO, J. A.; AFIUNE, J. B. Tuberculose Multirresistente. *Jornal de Pneumologia*, São Paulo, v.18, n.2, p. 73-82, 1993.

FIÚZA DE MELO, F. A.; AFIUNE, J. B. Transmissão e imunopatogenia da Tuberculose *Jornal de Pneumologia*, São Paulo, v.19, n.1, p. 19-24, 1993.

FLUIT, A. D. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.14, n.4, p.836-871. 2001.

FRANZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; McLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; MADICO, G.; HERNADEZ, A.; DEGNAN, M. T.; COOK, M. B.; QUENZER, V. K.; FERGUSON, R. M.; GILMAN, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue Assay. *J. Clin. Microb.*, Washington – D.C., v.36, n.2, p.362-366, 1998.

GONZALES-Y-MERCHAND, J. A ; ESTRADA-GARCIA, I.; COLSTON, M. J.; COX, R. A. A novel method for the isolation of mycobacterial DNA . **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdan, v.135, p. 71-77, 1996.

GROENEN, P. M. A.; BUNSCHOTEN, A. E.; VAN SOOLINGER, D., VAN EMBDEN, J. D. A. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*, Application for strain differentiation by a novel method. **Mol. Microbiol.**, Orlando, v.10, n.5, p.1057-1065, 1993.

HAAS, W. H.; SCHILKE, K.; BRAND, J.; AMTHOR, B.; WEYNER, K.; FOURIE, P. B.; BRETZEL, G.; STICHT-GROH, B.; BREMER, H. J. Molecular analysis of *katG* mutation in strain of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington - D.C., v.41, n.7, p.1601-1603, 1997.

HEYM, B.; ALZARI, P. M.; HONORÉ, N.; COLE, S. T. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol. Microbiol.**, Orlando, v.15, n.2, p.235-245, 1995.

HEYM, B.; STRAVOPOULOS, E.; HONORE, N.; DOMENECH, P., SAINT-JOANIS, B.; WILSON, T. M.; COLLINS, D. M.; COLSTON, M. J.; COLE, S. T. Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxide redutase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, Washington – D.C., v.65, n.4, p.1395-1401, 1997.

HEYM, B.; SAINT-JOANIS, B.; COLE, S. T. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tubercle and lung disease**, London, v. 79, n.4, p.267-271, 1999.

HIJJAR, M.A. Tuberculose problema atual. **J. Bras. Microbiol.**, São Paulo, V.66, n.3, p.123-145, 1994.

HIJJAR, M.A.; OLIVEIRA, M.J.P.R.; TEIXEIRA,G. A tuberculose no Brasil e no mundo. **Bol. Pneumol. Sanit.**, Rio de Janeiro, v.9, n.2, p.9-16, 2001.

HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; MAMIZUKA, E. M.; LEITE, C. Q. F. Aplicação de técnicas de biologia molecular na avaliação da resistência de *M. tuberculosis* a drogas antimicrobianas. **Rev. Ciênc. Farm.**, Araraquara-SP, v.18, n.1, p.87-100, 1997.

JOHNSSON, K.; FROLAND, W.A.; SCHULTZ, P.G. Overexpression, Purification, and Characterization of the Catalase-peroxidase KatG from *Mycobacterium tuberculosis*. **The J. Biol. Chem.** v. 272, n.5, p.2834-2840, 1997.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. **J. Clin. Microbial.**, Washington-D.C., v.35, n.4, p.907-914, 1997.

KAPUR, V.; LI, L. L.; HAMRICK, M. R.; PLIKAYTIS, B. B.; SHINNICK, T. M.; TELENTI, A. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Northfield, v.119, p.131-138, 1995.

KAYE, K., & FRIEDEN, T. R. Tuberculosis control: The relevance of classic principles in an era of Acquired Immunodeficiency Syndrome and Multidrug resistance. **Epidemiol. Rev.**, v.18, n.1, p.52-63, 1996.

KELLEY, C. L.; ROUSE, D. A.; MORRIS, S. L. Analysis of *ahpC* gene mutations in isoniazid-resistente clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington - D.C., v.41, n.9, p.2057-2058, 1997.

KENT, P. T. & KUBICA, G. P. **Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory.** U.S Department of Health and Human Services. CDC. Atlanta, Georgia, 1985.

LEE, A. S. G.; TANG, L. L. H.; LIM, I. H. K.; LING, M. L.; TAY, L.; WONG, S. Y. Lack of clinical significance for the common arginine-to-leucine substitution at codon 463 of the *katG* gene in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.176, p.1125-1127, 1997.

LEE, A. S. G.; LIM, I. H.; TANG, L. L. H.; TELENTI, A.; WONG, S. Y. Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington - D.C., v.43, n.8, p.2087-2089, 1999.

LEE, A.S.G.; TEO, A.S.M.; WONG, S.Y. Novel mutations in *ndhI* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington - D.C., v.45, n. 7, p.2157-2159, 2001.

MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, G.; QUÉMARD, A. Inha, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. **Mycobiology**, London, v.146, p.289-296, 2000.

MARTTILA, H. J.; SOINI, H. HUOVINEN, P.; VIJANEN. *KatG* mutations in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from finnish patients. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington - D.C., v.40, n.9, p.2187-2189, 1996.

MARTTILA, H. J.; SOINI, H.; EEROLA, E.; VYSHNEVSKAYA, E.; VYSHNEVSKIY, B. I.; OTTEN, T. F.; VASILYEF, A. V.; VILJANEN, M. K. A Ser315Thr substitution in *KatG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petesburg area in Russia. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington - D.C., v.42, n.9, p.2443-2445, 1998.

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

MDLULI, K.; SLAYDEN, R. A.; ZHU, Y.; RAMASWAMY, S.; PAN. X.; MEAD, D.; CRANME, D. D.; MUSSER, J. M.; BARRY III, C. E. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl ACP Synthase by isoniazid. **Science**, Washington - D.C., v.280, p.1607-1610, 1998a.

MDLULI, K.; SWANSON, J.; FISHER, E.; LEE, R. E.; BARRY III, C. E. Mechanisms involved in the intrinsic isoniazid resistance of *Mycobacterium avium*. **Mol. Microbiol**, Orlando, v.27, n.6, p.1223-1233, 1998b.

METCHOCK, B. G.; NOLTE, F. S.; WALLACE JR, R. J. In: MURRAY, P. R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Mycrobiology**, Americam Society for Mycrobiology Press, Washington D.C. 1999. p. 399-437.

MIESEL, L; WEISBROD, T. R.; MARCINKEVICIENE, J.A.; BITTMAN, R.; JACOBS JR., W. R. NADH dehydrogenase Defects Confer Isoniazid resistance and Conditional Lethality in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol**. Washington – D.C., v.180, n. 9, p. 2459 – 2467, 1998

MITCHINSON, D. A. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. **Tubercle Lung Dis**, London., v.2, n.1, p.10-15, 1998.

MOKROUSOV, I.; OTTEN, T.; UYSHNEVSKIY, B.; NARVSKAYA, O. Detection of emb B306 mutations in Ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: Implications for genotypic resistance testing. **J. Clin. Microbiol.**, Washington – D.C., v.40, n.10, p.3810-3813, 2002a.

MOKROUSOV, I.; NARVSKAYA, O.; OTTEN, T.; LIMESCHENKO, E.; STEKLOVA, L.; VYSHNEVSKIY, B. High prevalence of katG Ser315Thr substitution among Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington - D.C., v.46, n.5, p.1417-1424, 2002b.

MOLHUIZEN, H. O. F.; BUNSCHOTEN, A. E.; SCHOULS, L. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. – Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by Spoligotyping – In : PARISH, T.; STOKER, N. G. **Methods in Molecular Biology**, vol.101: **Mycobacteria Protocols**, Humana Press, Inc. Totowa, NJ. 1998. p. 381-394.

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*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.171, p.954-960, 1995.

MORRIS, S. L. & ROUSE, D. A. The genetics of multiple drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and the *Mycobacterium avium* complex. **Rev. Microb.** v.147, n.(1-2), p.68-73, 1996.

MUSSER, J. M. Antimicrobial agent resistance in Mycobacteria: Molecular genetic insights. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington – D.C., 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. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.173, p.196-202, 1996.

MUSSER, J.M. Reply. **J. Infect Dis.**, Chicago, v.176, p.1125-1127, 1997.

NACHANKIN, I.; KANG, C.; WEINSTEIN, M.P. Detection of resistance to isoniazid, rifampin, and streptomycin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by molecular methods. **Clinical infectious Diseases**, Chicago, v.24, p.894-900. 1997.

NOLLAU, P. & WAGENER, C. Methods for detection of point mutations: Performance and quality assessment the IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. **J. Int. Fed. Clin. Chem.**, v.9, n.4, p.162-170, 1997.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. El Controle de la tuberculosis em las Américas. **Boletín Epidemiológico/OPS**, v.19, n.2, p.1-8. 1998.

PALACI, M.; UEKI, S. Y. M.; CURCIO, M.; TELLES, M. A. S. Quimioterapia da tuberculose: fundamentos, regimes e resistência bacteriana. **Rev. Ciênc. Farm.**, Araraquara-São Paulo, v.18, n.1, p.29-40, 1997.

PINHEIRO, N. A.; MOURA, R. P.; MONTEIRO, E.; VILLA, L. L. Detection of point mutations by non-isotopic single strand conformation polymorphism. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v.32, n.1, p.55-58, 1999.

PINTO, W.P.; HADAD, D.J.; PALHARES, M.C.; FERRAZOLI, L.; TELLES, M.A.S.; UEKI, S.Y.M.; SANTOS, M.T.F.; PLACCO, A.L.N.; SAUAIA, N.; PALACI, M. Drug resistance of *M. tuberculosis* isolated from patients with HIV infection seen at an AIDS reference center in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.38, n.1, p.15-22, 1996.

PORRO, M., VITI, S., ANTONI, G., SALETTI, M. Ultrasensitive silver-stain method for the detection of proteins in polyacrilamide gels and immunoprecipitates on agarose gels. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.127, n.2, p.316-321, 1982.

PRETORIUS, G. S.; van HELDEN, P. D.; SIRGEL, F.; EISENACH, K. D.; VICTOR T. C. Mutation in *katG* gene sequences in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* are rare. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington - D.C., v. 39, n.10, p.2276-2281, 1995.

QUÉMARD, A.; SACCHETTINI, J. C.; DESSEN, A.; VILCHEZE, C.; BITTMAN, R.; JACOBS, W. R.; BLANCHARD, J. S. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, Columbus, v.34, p.8235-8241, 1995.

RAMASWAMY, S. & MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : 1998 update. **Tubercle and Lung Disease**, v.79, n.1, p.3-29, 1998.

RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular perspectives. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v.4, n. 2, p.195-207, 1998.

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

ROUSE, D. A.; ZHONGMING, L.; BAI, G. H.; MORRIS, S. L. Characterization of *katG* and *inhA* of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington - D.C., v.39, n.11, p.2472-2477, 1995.

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

ROZWARSKI, D. A.; GRANT, G. A.; BARTON, D. H. R.; JACOBS, W. R.; SACCHETTINI, J. C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, Washington - D.C., v.279, p.98-102, 1998.

SACCHETTINI, J. C. & BLANCHARD, J. S. The structure and function of the isoniazid target in *M. tuberculosis*. **Res. Microbiol.**, Paris, v.147, n.1-2, p.36-43, 1996.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.R., MANIATIS, T. Commonly used techniques in molecular cloning. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989a. cap. 6, p.6.3-6.19.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.R., MANIATIS, T. Gel electrophoresis of DNA In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989b. E5-E7.

SATO, D. N. - Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. **Dissertação de Mestrado**. Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

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**, Washington -D.C., v.272, p.1641-1643, 1996.

SHINNICK, T. M. & GOOD, R. C. Mycobacterial Taxonomy. **Eur. J. Clin. Infect. Dis.**, Paris, v. 13, n.11, p. 884-901, 1994.

SIDDIQI, N.; SHAMIM, M.; HUSSAIN, S.; CHOUDHARY, R.K.; AHMED, N.; PRACHEE; BANERJEE, S.; SAVITHRI, G.R.; ALAM, M.; PATHAK, N.; AMIN, A.; HANIEF, M.; KATOCH, V.M.; SHARMA, S.K.; HASNAIN, S.E. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Patients in North India. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington – D.C., v.46, n.2, p.443-450, 2002.

SLAYDEN, R. A. & BARRY 3rd, C. E. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infections**. V.2, p.659-669, 2000.

SMITH, P. G.; MOSS, A. R. Epidemiology of Tuberculosis. In: BLOOM, B. R. Tuberculosis: **pathogenesis, protection, and control**. American Society for Microbiology Press, Washington - DC. 1994, p.47 – 59.

SMITHWICK, R. S. **Laboratory Manual for Acid-Fast Microscopy**. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Center for Disease Control and Control, Atlanta, Georgia, 1976. 40 p.

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

SOINI, H.; PAN, X.; AMIN, A.; GRAVISS, E.A.; SIDDIQUI, A.; MUSSER, J.M. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients in Houston, Texas, by Spoligotyping. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.2, p.669-676, 2000.

SOMOSKOVI, A.; PARSONS, L. M.; SALFINGER, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Respir. Res.**, London, v.2, n.3, 2001.

SREEVATSAN, S.; PAN, X.; ZHANG, Y.; DERETIC, V. ; MUSSER, J. M. Analyses of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington - D.C., v.41, n.3, p.600-606, 1997.

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

TELENTI, A.; HONORÉ, N.; BERNASCONI, MARCH, J.; ORTEGA, A.; HEYM, B.; TAKIFF, H.E.; COLE, S.T. Genotypic assessment of isoniazid and Rifanpin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. **J. Clin. Microbiol.**, Washington – D.C., v.35, p.719-723. 1997.

TELENTI, A Genetics of drug resistant Tuberculosis. **Thorax**, v.53, p.793-797, 1998.

TELENTI, A.; HONORÉ, N.; COLE, S. T. Detection of mutations in *Mycobacteria* by PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) . In : PARISH, T.; STOKER, N. G. **Methods in Molecular Biology, vol.101: Mycobacteria Protocols**, Humana Press, Inc. Totowa, NJ. 1998. p. 423-430.

TEMESGEN, Z.; SATOH, K.; UHL, J.R.; KLINE, B.C.; COCKERILL III, F.R. Use of polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis to detect a point mutation in the catalase-peroxidase gene (*katG*) of *mycobacterium tuberculosis*. **Molecular and Cellular Probes.**, v.11, p. 59-63, 1997.

VAN DOORN, H. R.; KUIJPER, E. J.; VAN DER ENDE A.; WELTEN, A. G.; VAN SOOLINGER, D.; DE HASS, P. E.; DANKERT, J. The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg→Leu mutation at codon 463 of Kat G are not associated. **J. Clin. Microbiol.**, Washington – D.C, v.39, n.4, p.1591-1594, 2001.

VAN RIE, A.; WARREN, R.; MSHANGA, I.; JORDAAN, A.M.; SPUY, G.D.V.D.; RICHARDSON, M.; SIMPSON, J.; GIE, R.P.; ENARSON, D.A.; BEYERS, N.; HELDEN, P.D.V.; VICTOR, T.C. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a High-incidence community. **J. Clin. Microbiol.**, Washington – D.C, v.39, n.2, p.636-641, 2001.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E.; VAN DOORN, H. R.; KUIJPER, E.; RINDER, H.; BORGDORFF, M. W. Mutations at amino acid position 315 of the Kat G gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Netherlands. **J. Infect. Dis**, Chicago, v.182, n.6, p.1788-1790, 2000.

WENGENACK, N. L.; TODOROVIC, S.; YU, L.; RUSNAK, F. Evidence for Differential Binding of Isoniazid by *Mycobacterium tuberculosis* katG and the isoniazid-resistant mutant katG(S315T). **Biochemistry**, Columbus, v.37, p. 15825 – 15834, 1998.

WELSH, J. A., CASTRÉN, K., VAHAKANGAS, K. H. Single-Strand Conformation polymorphism analysis to detect p53 mutations: characterization and development of controls. **Clin. Chem.**, Washington, D. C., v. 43, n. 12, p.2251-2255, 1997.

WILSON, T. M.; COLLINS, D. M. *AhpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Mol. Microbiol.**, Orlando v.19, n.5, p.1025-1034. 1996.

WILSON, T. M.; LISLE, G. W.; COLLINS, D. M. Effect of *inhA* and *katG* on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. **Mol. Microbiol.** Orlando, v.15, n.6. p.1009-1015, 1995.

WILSON, T.; LISLE, G.W.; MARCINKEVICIENE, J.A.; BLANCHARD, J.S.; COLLINS, D.M. Antisense RNA to *ahpC*, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that *AhpC* of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. **Microbiology**, London v.144, p.2687-2695. 1998.

ZHANG, Y.; GARBE, T.; YOUNG, D. B. Transformation with *KatG* restores isoniazid sensibility in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. **Mol. Microbiol.**, Orlando, v.8, p.521-524, 1993.

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

ZHANG, Y. & TELENTI, A. Genetic of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* . In: HATFULL, G. H.; JACOBS, W. R. **Molecular Genetics of Mycobacteria**. ASM. Press, Washington – D.C, 2000. p. 235-254.

ZHANG, Y.; YOUNG, D. B. Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.34, p.313-319, 1994.

8. ANEXOS

8.1 Procedência, valores da CIM e padrões de “Spoligotyping” dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e resistentes a INH.

Anexo A. Relação e perfil de resistência dos isolados de *M. tuberculosis* procedentes do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto – SP – Brasil.

Isolado de <i>M. tuberculosis</i>	Perfil de resistência
16	INH , RMP
36	Sensível
48	INH , RMP , SM , EMB
F4	INH , SM
106	INH
91	INH , SM
26A	INH
27A	INH
28A	INH
29A	INH
30A	INH
32A	INH , RMP
35A	INH , RMP
37A	INH , RMP
38A	INH , RMP
39A	INH , RMP
40A	INH , RMP
41A	INH , RMP
44A	INH , RMP , PZA
48A	INH , RMP , PZA
49A	INH , RMP , PZA , EMB , SM
57A	INH
61A	INH , RMP
63A	INH , RMP
64A	INH , RMP
68A	INH , RMP , PZA
69A	INH , RMP , PZA
71A	INH , RMP , PZA
72A	INH , RMP , PZA
73A	INH , RMP , PZA
74A	INH , RMP , SM
462	INH , RMP , SM
225	INH
505	INH , RMP
18	INH , RMP , EMB
302	INH
309	INH , RMP , SM
227	INH
485	INH , RMP , SM
463	INH
19	INH , RMP , EMB
411	INH , SM
531	INH , SM
470	INH
503	INH , RMP , SM , EMB
25	INH
108	INH , RMP , EMB , SM
109	INH , RMP
114	INH , RMP , EMB

Anexo B. Relação e perfil de resistência dos isolados de *M. tuberculosis* procedentes do Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba – SP – Brasil.

Isolado de <i>M. tuberculosis</i>	Perfil de resistência
71-C	INH, RMP, PZA
211-C	INH
148-S	INH, RMP, EMB, SM
92-C	INH, RMP
65-S	INH
97-S	INH, RMP, SM
192-S	INH, SM
67-C	INH, SM
251-S	INH, RMP
123-C	INH, RMP, SM
4 M	INH, RMP
1362	INH, RMP
36-C	INH, RMP
37-C	INH
2542	INH, RMP, ETH
4250	INH, RMP
5355	INH, RMP
6215	INH, RMP
5132	INH, SM
5178	INH, SM
3817	INH, RMP, SM
3818	INH, RMP, SM
4850	INH, PFP, SM EMB, PZA
4509	INH
6257	INH
461	INH
1091	INH
6233	Sensível
742	Sensível
46-S	INH, RMP, PZA
4288	INH
4851	Sensível

Anexo C: Relação e perfil de resistência dos isolados de *M. tuberculosis* procedentes do Instituto Clemente Ferreira – São Paulo – SP – Brasil.

Isolado de <i>M. tuberculosis</i>	Perfil de resistência
3360/00	INH, SM
2148/00	INH , SM , EMB
3408/00	INH , RMP , SM , EMB
2965/00	INH , SM , EMB
2390/00	INH , SM
2075/00	INH , SM
116/00	INH , RMP , SM , EMB
2130/00	INH , RMP
3446/00	INH , RMP , EMB
3543/00	INH , RMP , SM , EMB
3614/00	INH , RMP , SM , EMB
2193/00	INH , RMP
3401/00	INH , RMP , SM , EMB
1206/01	INH , RMP
1193/01	INH , RMP , SM , EMB
803/01	INH , RMP , SM , EMB
11181	Sensível
1235	Sensível

Anexo D: Relação e perfil de resistência dos isolados de *M. tuberculosis* procedentes do laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá – Paraná – Brasil.

Isolado de <i>M. tuberculosis</i>	Perfil de resistência
5269	INH , PZA
17204	INH
118	INH , RMP , PZA
973	INH , RMP
12877	Sensível
21653	Sensível
V17	Sensível
V10	Sensível
V18	Sensível
V7	Sensível
11896	Sensível
11152	Sensível
4526	Sensível
V13	Sensível
15621	Sensível
5039	Sensível
405	Sensível
5095	Sensível
24024	PZA
1778	Sensível
2238	Sensível
15025	Sensível
1238	Sensível
Nestor	Sensível
364	Sensível
22265	Sensível
483	Sensível
João K.	Sensível
23130	PZA , SM
23155	Sensível
13638	Sensível
21844	Sensível
17433	Sensível
19026	Sensível
6230	Sensível
4812	Sensível
23413	Sensível
22842	Sensível
4790	Sensível
17462	EMB
23417	Sensível
Arlindo	Sensível
22440	Sensível
7188	Sensível
10125	SM
14972	Sensível
2547	Sensível
18020	EMB
2320	Sensível
1997	Sensível
22713	Sensível

3693	Sensível
23657	Sensível
25252	Sensível
1264	PZA
3224	PZA
17711	Sensível
18044	Sensível

Anexo E: Sequências e concentrações dos oligonucleotídeos espaçadores usados na realização da marcação da membrana de Biodyne C para realização da técnica de “Spoligotyping”.

Espaçador	Sequência de oligonucleotídeos	Concentração (pmol/150µl)
1	ATAGAGGGTCGCCGGTTCTGGATCA	12,5
2	CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG	30,0
3	CCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA	12,5
4	ACGTCATACGCCGACCAATCATCAG	12,5
5	TTTTCTGACCACTTGTGCGGGATTA	12,5
6	CGTCGTCATTTCCGGCTTCAATTTT	12,5
7	GAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGC	25,0
8	CGTGAAACCGCCCCAGCCTCGCCG	50,0
9	ACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC	12,5
10	TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC	15,0
11	GTGAGCAACGGCGGCGCAACCTGG	30,0
12	GTGAGCAACGGCGGCGGCAACCTGG	60,0
13	GACCATCATTGCCATTCCCTCTCCC	12,5
14	GGTGTGATGCGGATGGTTCGGCTCGG	30,0
15	CTTGAATAACGCGCAGTGAATTTTCG	30,0
16	CGAGTTCCCGTCAGCGTCGTAAATC	12,5
17	GCGCCGGCCCCGCGCGGATGACTCCG	100,0
18	CATGGACCCGGGCGAGCTGCAGATG	12,5
19	TAAGTGGCTTGCGCTGATCCTGGT	12,5
20	TTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA	12,5
21	TCGATGTGATGTCCCAATCGTCGA	25,0
22	GATCAGCGACCACCGCACCTGTCA	12,5
23	AGCATCGCTGATGCGGTCCAGCTCG	50,0
24	CCGCCTGCTGGGTGAGACGTGCTCG	50,0
25	GATCAGCGACCACCGCACCTGTCA	25,0
26	CTTCAGCACCAACATCATCCGGCGC	12,5
27	GGATTCGTGATCTCTTCCCGCGGAT	25,0
28	TGCCCCGGCGTTTAGCGATCACAAC	12,5
29	AAATACAGGCTCCACGACACGACCA	12,5
30	GGTTGCCCCGCGCCCTTTCCAGCC	12,5
31	TCAGACAGGTTTCGCGTCGATCAAGT	12,5
32	GACCAAATAGGTATCGGCGTGTTCA	25,0
33	GACATGACGGCGGTGCCGCACTTGA	100,0
34	AAGTCACCTCGCCACACCGTCGAA	25,0
35	TCCGTACGCTCGAAACGCTTCCAAC	12,5
36	CGAAATCCAGCACCATCCGCAGC	12,5
37	CGCGAACTCGTCCACAGTCCCCCTT	12,5
38	CGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGC	25,0
39	GACGATGGCCAGTAAATCGGCGTGG	25,0
40	CGCCATCTGTGCCTCATACAGGTCC	12,5
41	GGAGCTTTCGGCTTCTATCAGGTA	12,5
42	ATGGTGGGACATGGACGAGCGCGAC	25,0
43	CGCAGAATCGCACCGGGTGCGGGAG	50,0

Anexo F: CIM para INH e Padrões de Spoligotyping encontrado em 157 isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes a isoniazida.

n	Isolados	Spoligotyping	CIM	Origem
1	5095	7 7 7 7 6 1 0 0 0 0 0 0 0 0	S	Maringá
2	12877	7 7 7 5 7 7 6 0 0 0 0 0 0 0	S	Maringá
3	74A	7 7 7 6 1 7 6 0 0 0 0 0 0 0	8 µg/mL	Rib. Preto
4	470	7 4 7 7 7 7 6 0 0 0 0 0 0 0	1 µg/mL	Rib. Preto
5	1091	7 7 7 5 7 7 7 7 7 7 0 0 0 1	32 µg/mL	Sorocaba
6	19026	7 7 6 1 6 1 0 0 0 0 0 0 0 7	S	Maringá
7	17462	7 7 6 1 7 7 4 0 0 0 0 0 1 7	EMB	Maringá
8	211-S	7 7 7 7 7 7 6 6 0 0 0 0 1 7	>32 µg/mL	Sorocaba
9	4851	7 7 7 7 3 7 7 7 7 7 6 0 4 7	S(< 0,25)	Sorocaba
10	2965/00	7 7 7 7 5 7 7 7 7 7 6 0 5 7	4 µg/mL	São Paulo
11	227	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 4 2 0 6	>32 µg/mL	Rib. Preto
12	16	7 7 7 3 7 7 7 7 7 7 6 0 6 1	4 µg/mL	Rib. Preto
13	22842	7 7 7 7 3 7 7 7 7 7 6 0 6 1	S	Maringá
14	V.13	7 7 7 7 3 7 7 7 7 7 6 0 6 1	S	Maringá
15	V.17	7 7 7 7 3 7 7 7 7 7 6 0 6 1	S	Maringá
16	V.18	7 7 7 7 3 7 7 7 7 7 6 0 6 1	S	Maringá
17	5269	6 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 1	2 µg/mL	Maringá
18	4250	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 1	16 µg/mL	Sorocaba
19	11152	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 1	S	Maringá
20	2148/00	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 1	>32 µg/mL	São Paulo
21	63A	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 1	8 µg/mL	Rib. Preto
22	17433	7 7 6 1 7 7 6 0 7 7 6 0 7 3	S	Maringá
23	461	6 7 6 3 7 7 7 7 3 7 4 0 7 3	16 µg/mL	Sorocaba
24	2320	7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 6 0 7 3	S	Maringá
25	106	7 7 7 7 1 7 6 0 7 7 6 0 7 3	32 µg/mL	Rib. Preto
26	364	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 3	S	Maringá
27	35A	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 3	8 µg/mL	Rib. Preto
28	38A	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 3	8 µg/mL	Rib. Preto
29	41A	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 3	8 µg/mL	Rib. Preto
30	48A	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 3	8 µg/mL	Rib. Preto
31	61A	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 3	4 µg/mL	Rib. Preto
32	148-S	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 3	>32 µg/mL	Sorocaba
33	39A	7 7 7 7 7 7 6 0 7 5 6 0 7 7	4 µg/mL	Rib. Preto
34	27A	7 7 7 7 7 7 7 7 4 0 0 0 7 7	>32 µg/mL	Rib. Preto
35	23657	7 7 6 3 7 7 7 7 4 0 2 0 7 7	S	Maringá
36	742	7 7 7 7 7 7 7 7 4 0 2 0 7 7	S	Sorocaba
37	5178	7 7 7 7 7 7 7 7 4 0 2 0 7 7	8 µg/mL	Sorocaba
38	6215	7 7 7 7 7 7 7 7 4 0 2 0 7 7	4 µg/mL	Sorocaba
39	2075/00	7 7 7 7 7 7 7 7 4 0 2 0 7 7	4 µg/mL	São Paulo
40	21844	7 5 7 7 7 1 6 0 6 5 6 0 7 7	S	Maringá
41	7188	7 7 7 7 3 7 6 0 6 5 6 0 7 7	S	Maringá
42	1264	7 7 7 7 7 7 6 0 7 5 6 0 7 7	PZA	Maringá
43	5039	7 7 7 7 7 7 6 0 7 5 6 0 7 7	S	Maringá
44	6230	7 7 7 7 7 7 6 0 7 5 6 0 7 7	S	Maringá
45	97-S	7 7 7 7 7 7 6 0 7 5 6 0 7 7	16 µg/mL	Sorocaba
46	2542	7 7 7 6 3 7 4 1 7 5 6 0 7 7	>32 µg/mL	Sorocaba
47	405	7 7 7 7 6 5 0 4 7 5 6 0 7 7	S	Maringá

48	21653	7 7 7 7 6 5 0 4 7 5 6 0 7 7 1	S	Maringá
49	João K	7 7 7 7 3 7 6 6 3 5 6 0 7 7 1	S	Maringá
50	485	6 7 7 7 3 7 6 0 7 6 0 0 7 7 1	4 µg/mL	Rib. Preto
51	505	6 7 7 7 3 7 6 0 7 6 0 0 7 7 1	4 µg/mL	Rib. Preto
52	483	6 7 7 7 3 7 6 0 7 6 2 0 7 7 1	S	Maringá
53	36	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	S(< 0,25)	Rib. Preto
54	48	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	4 µg/mL	Rib. Preto
55	118	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	16 µg/mL	Maringá
56	225	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	8 µg/mL	Rib. Preto
57	973	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	32 µg/mL	Maringá
58	1193/01	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	2 µg/mL	São Paulo
59	29A	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	>32 µg/mL	Rib. Preto
60	32A	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	8 µg/mL	Rib. Preto
61	3360/00	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	16 µg/mL	São Paulo
62	3543/00	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	4 µg/mL	São Paulo
63	44A	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	>32 µg/mL	Rib. Preto
64	57A	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	>32 µg/mL	Rib. Preto
65	67-C	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	4 µg/mL	Sorocaba
66	69A	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	4 µg/mL	Rib. Preto
67	71A	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	8 µg/mL	Rib. Preto
68	71-C	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	8 µg/mL	Sorocaba
69	72A	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 2 0 7 7 1	8 µg/mL	Rib. Preto
70	4850	6 7 7 7 7 7 0 0 1 7 6 0 7 7 1	16 µg/mL	Sorocaba
71	116/00	6 7 7 7 7 7 0 0 3 7 6 0 7 7 1	16 µg/mL	São Paulo
72	503	0 0 0 0 0 0 0 0 7 7 6 0 7 7 1	32 µg/mL	Rib. Preto
73	25252	0 0 0 0 0 0 0 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
74	65-S	0 0 0 0 0 0 0 0 7 7 6 0 7 7 1	1 µg/mL	Sorocaba
75	23155	6 6 1 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
76	192-S	6 7 3 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Sorocaba
77	18	7 7 6 1 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Rib. Preto
78	19	7 7 6 1 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Rib. Preto
79	109	7 7 6 1 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	16 µg/mL	Rib. Preto
80	114	7 7 6 1 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Rib. Preto
81	309	7 7 6 1 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	16 µg/mL	Rib. Preto
82	411	7 7 6 1 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	8 µg/mL	Rib. Preto
83	68A	7 7 6 1 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	8 µg/mL	Rib. Preto
84	V.10	7 7 6 1 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
85	V.7	7 7 6 1 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
86	1997	6 7 6 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
87	1362	7 7 7 5 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Sorocaba
88	F4	7 7 7 7 1 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	2 µg/mL	Rib. Preto
89	91	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Rib. Preto
90	108	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	8 µg/mL	Rib. Preto
91	462	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	8 µg/mL	Rib. Preto
92	463	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	8 µg/mL	Rib. Preto
93	531	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	16 µg/mL	Rib. Preto
94	3817	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	8 µg/mL	Sorocaba
95	3818	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Sorocaba
96	15621	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
97	23130	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	PZA SM	Maringá
98	2130/00	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	>32 µg/mL	São Paulo

99	3614/00	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	>32 µg/mL	São Paulo
100	64A	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	16 µg/mL	Rib. Preto
101	73A	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	32 µg/mL	Rib. Preto
102	92-C	6 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	16 µg/mL	Sorocaba
103	26A	7 7 7 7 3 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Rib. Preto
104	25	0 0 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	2 µg/mL	Rib. Preto
105	11896	0 0 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
106	23413	3 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
107	23417	3 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
108	251-S	3 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Sorocaba
109	6233	6 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Sorocaba
110	22713	6 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
111	28A	6 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Rib. Preto
112	Nestor	6 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
113	302	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	>32 µg/mL	Rib. Preto
114	1235	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	São Paulo
115	1238	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
116	2238	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
117	2547	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
118	3693	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
119	4288	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	8 µg/mL	Sorocaba
120	5132	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Sorocaba
121	5355	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	>32 µg/mL	Sorocaba
122	6257	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	16 µg/mL	Sorocaba
123	11181	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	São Paulo
124	14972	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
125	15025	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
126	17204	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Maringá
127	17711	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S(< 0,25)	Maringá
128	18044	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
129	22265	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
130	1206/01	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	>32 µg/mL	São Paulo
131	2193/00	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	São Paulo
132	2390/00	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	NG	São Paulo
133	3446/00	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	32 µg/mL	São Paulo
134	37A	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	>32 µg/mL	Rib. Preto
135	40A	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	>32 µg/mL	Rib. Preto
136	49A	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	NG	Rib. Preto
137	4790	7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
138	36-C	7 7 4 0 0 0 0 1 7 7 6 0 7 7 1	8 µg/mL	Sorocaba
139	4812	7 7 7 7 7 7 6 1 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
140	37-C	7 7 7 7 7 7 5 5 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Sorocaba
141	4M	7 7 7 7 7 7 5 5 7 7 6 0 7 7 1	4 µg/mL	Sorocaba
142	13638	7 7 5 7 7 7 7 5 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
143	4509	7 7 0 0 0 0 3 7 7 7 6 0 7 7 1	>32 µg/mL	Sorocaba
144	H37Rv	7 7 7 7 7 7 4 7 7 7 6 0 7 7 1	Padrão S	Rio de Janeiro
145	18020	7 7 7 6 1 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	EMB	Maringá
146	1778	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1		Maringá
147	3224	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	PZA	Maringá
148	4526	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
149	10125	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	SM	Maringá

150	22440	7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
151	24024	7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	PZA	Maringá
152	123-C	7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	32 µg/mL	Sorocaba
153	30A	7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	8 µg/mL	Rib. Preto
154	46-S	7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	>32 µg/mL	Sorocaba
155	803/01	7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	16 µg/mL	São Paulo
156	Arlindo	7 7 7 7 7 7 7 7 7 6 0 7 7 1	S	Maringá
157	3401/00	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3 7 7 1	>32 µg/mL	São Paulo
158	3408/00	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3 7 7 1	>32 µg/mL	São Paulo