

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE COLORIMÉTRICO
PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA EM
ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis*.**

RAQUEL DE ABREU MASCHMANN

Porto Alegre, agosto de 2008.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

Raquel de Abreu Maschmann

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE
COLORIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA
À RIFAMPICINA EM ISOLADOS DE *Mycobacterium
tuberculosis*.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Maria Lucia Rosa Rossetti

Co-orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, agosto de 2008.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) com apoio financeiro da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Financiadora de estudo e projetos (FINEP) e da Rede-TB.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Maria Lúcia Rossetti meu eterno agradecimento pela oportunidade, confiança e acima de tudo pelos ensinamentos, pelo carinho e dedicação na orientação deste trabalho.

Ao Dr. Arnaldo Zaha pela co-orientação e grande ajuda na realização deste trabalho. Muito obrigada pela confiança e oportunidade.

À FEPPS, em especial ao CDCT e ao Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose, à querida Martinha pela oportunidade de realização deste trabalho.

A todas as colegas e amigas do CDCT pelo excelente convívio, amizade, solidariedade e por ofertarem todo o suporte e estímulo na conquista dos meus objetivos neste trabalho. Adoro vocês!!

Ao grupo de resistência; às colegas Elis, Lili, Nani e Fernanda pela ajuda a parceria e pela amizade. À Márcia, que sempre esteve presente com constante auxílio e sugestões, obrigada pelo carinho e amizade. À Dea pelos ensinamentos e paciência para ensinar. À colega e amiga Mirela pela parceria na bancada, pelos ensinamentos, com certeza sou uma pessoa muito melhor. Obrigada pela cumplicidade, amizade e carinho!

À colega e amiga Sabrina pela ajuda com a análise estatística.

À colega e amiga Lia, muito obrigada pelas valiosas sugestões.

À dedicada Karen, muito obrigada pelo auxílio e amizade.

À Frã, Regina e Luciana pelos momentos de descontração, incentivo e amizade.

À Pati e Andrezza pelos conselhos, pelas festas, incentivo e amizade.

Aos secretários do PPGBCM, Silvia Regina Centeno e Luciano Saucedo, pelo grande auxílio sempre com muita dedicação e bom humor.

Às minhas queridas amigas de longa data que compreenderam os momentos de minha ausência e pelo carinho constante.

A minha família, em especial meus queridos pais e meu querido irmão, por tudo; pelo incentivo e amor durante toda minha vida.

A todos que de alguma maneira e em algum momento contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABELAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. APRESENTAÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Tuberculose – magnitude da doença.....	15
2.1.1 Epidemiologia.....	16
2.1.2 Etiologia - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.1.3 Transmissão.....	18
2.2 Tratamento da TB.....	19
2.2.1 Fármacos anti-TB.....	20
2.3 Tuberculose Resistente.....	21
2.3.1 Fatores associados com o desenvolvimento da resistência.....	22
2.3.2 Mecanismos de resistência aos fármacos em <i>M. tuberculosis</i>	22
2.3.3 TB-MDR.....	23
2.3.4 Inquéritos de resistência.....	24
2.3.5 Mecanismo de ação e resistência dos principais fármacos anti-TB	27
2.4 Rifampicina	30
2.4.1 Mecanismo de ação da RMP em <i>M. tuberculosis</i>	32
2.4.2 Mecanismo de resistência do <i>M. tuberculosis</i> à RMP.....	32
2.4.3 Associação entre concentração mínima inibitória (CMI) e as mutações.....	35
2.5 Métodos para a detecção de resistência.....	37
2.5.1 Metodologias fenotípicas.....	37
2.5.2 Metodologias genotípicas.....	39
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo Geral.....	42
3.2 Objetivos Específicos.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 Tipo de Estudo.....	43
4.2 Local e desenvolvimento do estudo.....	43
4.3 Amostras.....	43
4.4 Critérios de inclusão.....	43

4.5 Critérios de exclusão.....	44
4.6 Aspectos éticos.....	44
4.7 Isolamento e cultura de <i>M. tuberculosis</i>	44
4.8 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA)	44
4.9 Extração de DNA de <i>M. tuberculosis</i> de cultura.....	45
4.10 Extração de DNA de <i>M. tuberculosis</i> de amostra clínica.....	45
4.11 Padronização da PCR-duplex	46
4.11.1 Oligonucleotídeos utilizados para reação da PCR (<i>primers</i>)	46
4.11.2 Reação de PCR.....	47
4.11.3 Condições da reação da PCR.....	47
4.11.4 Detecção do produto amplificado.....	47
4.11.5 Especificidade analítica dos oligonucleotídeos.....	48
4.12 Seqüenciamento.....	48
4.13 Detecção de resistência a RMP pelo Teste Colorimétrico de Hibridização Reversa (TCHR-TB)	48
4.13.1 Preparação da membrana (Biodyne C) e fixação dos oligonucleotídeos.....	49
4.13.2 Hibridização reversa e detecção colorimétrica.....	49
4.14 Análise estatística.....	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1 Teste de suscetibilidades aos antimicrobianos (TSA)	51
5.2 Padronização das condições da PCR-duplex.....	51
5.3 Seqüenciamento do fragmento amplificado.....	52
5.4 Especificidade analítica dos <i>primers</i>	52
5.5 Sensibilidade do método.....	52
5.6 Análise da região RRDR do gene <i>rpoB</i> pelo TCHR-TB	54
5.6.1 Comparação do TCHR-TB com método das proporções.....	54
5.6.2 Comparação do TCHR-TB com seqüenciamento.....	57
5.6.3 Comparação do TCHR-TB com o teste GenoType MTBDR.....	58
5.6.4 Comparação do TCHR-TB com TSA em amostras clínicas.....	59
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	67
8. BIBLIOGRAFIA.....	68
9. ANEXOS.....	82

LISTAS DE ABREVIATURAS

BCIP	5- bromo-4-chloro-3-indoyl Fosfato
BSA	Albumina de soro de bovino
BK	Bacilo de Koch
CDC	Centers of Disease Control
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CMI	Concentração mínima inibitória
CPM	Ciprofloxacina
CFZ	Clofazimina
CTAB	Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxinucleosídeos Trifosfatos
EDAC	<i>1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-Ethylcarbodiimide Hydrochloride</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EMB	Etambutol
ETH	Etionamida
FEPPS/RS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul
IS	Seqüência de inserção
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
INH	Isoniazida
LACEN-RS	Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul
LJ	Löwenstein-Jensen
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MODS	<i>Microscopic Observation Broth Drug Susceptibility Assay</i>
MTC	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido p-Aminosalicílico

pb	Pares de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
PEG	Polietilenoglicol
pmol	Picomol
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossômico
mRNA	RNA mensageiro
RNAP	RNA polimerase
RRDR	<i>Rifampin-Resistance-Determining Region</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SSC	Cloreto de Sódio + Citrato de Sódio
SM	Estreptomicina
TCHR	Teste Colorimétrico de Hibridização Reversa
TE	Tris+EDTA
TEB	Tris-Borato-EDTA
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multi droga resistente
TB-XDR	Tuberculose extensivamente droga resistente
TSA	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos
TZ	Tiacetazona
WHO	<i>World Health Organization</i>
µg	Micrograma
µM	Micromolar
µL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países com casos confirmados de TB-XDR no mundo.....	27
Figura 2. Ilustração da estrutura molecular da rifampicina.....	31
Figura 3. Esquema das mutações que ocorrem na região RRDR do gene <i>rpoB</i> no <i>M. tuberculosis</i>	33
Figura 4. Visualização dos produtos da PCR-duplex em gel de agarose 1,5%.....	51
Figura 5. Sensibilidade analítica da PCR-duplex.....	52
Figura 6. Localização dos oligonucleotídeos dentro da região RRDR de 80-pb do gene <i>rpoB</i>	54
Figura 7. Desenho da membrana e resultados mais comuns de padrões de hibridização com o TCHR-TB.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquemas de tratamento da TB utilizados no Brasil desde 1979.....	21
Tabela 2. Inquérito de Prevalência de Resistência no Brasil entre 1995 e 1997.....	25
Tabela 3. Mecanismo de ação, genes envolvidos na resistência, e alvos dos principais fármacos utilizados no tratamento da TB.....	30
Tabela 4. Mutações encontradas no gene <i>rpoB</i> em isolados de <i>M. tuberculosis</i> do Brasil.....	35
Tabela 5. Concentração crítica das drogas empregadas no teste de susceptibilidade de <i>M. tuberculosis</i> e proporção crítica de mutantes resistentes.....	38
Tabela 6. Características dos oligonucleotídeos do TCHR-TB.....	49
Tabela 7. Correlação entre TCHR-TB, seqüenciamento e teste de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de cultura.....	53
Tabela 8. Correlação entre TCHR-TB e teste de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de cultura.....	56
Tabela 9. Correlação entre TCHR-TB e sequenciamento dos isolados de cultura.....	58
Tabela 10. Correlação entre TCHR-TB, teste GenoType MTBDR e Seqüenciamento.....	59
Tabela 11. Correlação entre TCHR-TB das amostras clínicas	61

RESUMO

Nesse trabalho foi desenvolvido um Teste Colorimétrico de Hibridização Reversa (TCHR-TB) que verifica a presença de mutações em uma região específica do gene *rpoB*, que confere resistência à rifampicina. Foram analisados 156 DNAs de *M. tuberculosis* obtidos de cultura. Quando comparado com teste convencional de susceptibilidade às drogas, a sensibilidade e a especificidade do TCHR-TB foi 92.3% e 98.0% respectivamente. Comparando com o seqüenciamento, o qual é considerado padrão ouro, a sensibilidade e a especificidade do TCHR-TB foram 90% e 100%, respectivamente. Mutações no códon 531 seguido de mutações no códon 526 são as mutações mais comuns mundialmente, sendo responsáveis por aproximadamente 75% das amostras resistentes à RIF. O TCHR-TB detectou corretamente 100% destas mutações. O método desenvolvido pôde também detectar mutações no gene *rpoB* de DNA de *M. tuberculosis* extraídos diretamente de amostras clínicas. Trinta e três amostras clínicas foram testadas e os resultados do TCHR-TB foram 100% concordantes quando comparados com método das proporções. Os resultados do nosso estudo demonstraram uma alta taxa de concordância do TCHR-TB quando comparado com os testes de sensibilidade convencionais e com o seqüenciamento. O teste pode ser aplicado com sucesso quando se faz necessária uma rápida e sensível detecção de resistência à rifampicina e conseqüentemente um correto gerenciamento dos pacientes.

ABSTRACT

In this work a Reverse-Line Blot Hybridization (RLBH) assay was developed which allows the detection of mutation in a specific region of *rpoB* gene, that confer rifampicin resistance, in a panel of 156 DNAs of *M. tuberculosis* obtained from cultures. When compared to the conventional drug susceptibility testing (DST), sensitivity and specificity of the RLBH were 92.3% and 98.0%, respectively. Comparing to sequencing, which is considered a “gold standard” reference, sensitivity and specificity of the RLBH were 90% and 100%, respectively. Mutations at codon 531, followed by mutation at codon 526 are the most common mutations worldwide accounting for approximately 75% of RIF resistance. The RLBH assay correctly detected 100% of these mutations. The method developed could also detect *rpoB* mutations of *M. tuberculosis* in clinical specimens. Thirty-three clinical specimens were tested and the results of RLBH were 100% concordant when compared to DST. The results of our study demonstrate a high concordance rate when the RLBH results were compared to conventional methods and sequencing data. The test can be successfully applied when a rapid sensitivity testing is required for the correct management of patients.

1. APRESENTAÇÃO

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é um grupo de patógenos com baixa taxa reprodutiva e longo tempo de geração. A tuberculose (TB) é uma das doenças mais importantes que afeta a saúde humana, não apenas porque o número total de casos é especialmente alto (em torno de nove milhões/ano mundialmente), mas também porque, aproximadamente, um quarto dos doentes morrem, sendo a maioria deles adultos jovens (Dye *et al.*, 2002).

Os casos nos países em desenvolvimento, na maioria das vezes, refletem a pobreza, a falta de condições de vida e ausência de cuidados médicos (WAALER *et al.*, 2002). A crise global é composta ainda pelo surgimento de linhagens resistentes a múltiplos fármacos, onde alguns dos fármacos disponíveis são de qualidade inferior ou não são administrados durante tempo suficiente para o controle da doença, de acordo com os regimes recomendados (ISEMAN *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 2003).

A percentagem de pacientes contaminados por linhagens resistentes aumentou a ponto de pôr em risco o controle da doença. Aproximadamente, 10% dos novos casos testados na Estônia e Letônia são resistentes a múltiplos fármacos, chamados multi-droga resistentes (MDR), e excedem a 25% entre os casos já tratados anteriormente. O gerenciamento desta situação é um problema, pois o tratamento é mais tóxico e muito mais caro. A globalização apresenta conseqüências na transmissão de doenças infecciosas, e as linhagens resistentes podem surgir em qualquer local. A TB deve ser abordada como uma doença social e não apenas pelo ponto de vista clínico do indivíduo (DYE *et al.*, 2002; WHO, 2008).

Os pacientes infectados com linhagens resistentes apresentam menor chance de cura, pois usualmente o diagnóstico é tardio e, portanto permanecem por períodos maiores transmitindo tuberculose MDR para seus familiares, através de contatos sociais ou em ambientes fechados, como descrito nos EUA e no Leste Europeu (WHO, 1997; WHO, 2008).

A isoniazida (INH) e a rifampicina (RMP) são os dois fármacos mais potentes contra *M. tuberculosis*. Juntos são responsáveis pela eliminação de 99% dos bacilos sensíveis nos primeiros dois meses de tratamento, trazendo sérias

repercussões na epidemiologia e controle da TB se a linhagem for resistente a esses fármacos, característica da TB MDR.

A análise de DNA e a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos com a resistência auxiliam no desenvolvimento de metodologias para a detecção mais rápida dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes. Isto pode auxiliar na redução de linhagens resistentes circulantes e trazer benefícios para a saúde pública. Atualmente, está sendo testada uma variedade de métodos moleculares que buscam a detecção rápida de isolados de bactérias resistentes aos fármacos (ROSSETTI *et al.*, 2002; MORCILLO *et al.*, 2002; TORTOLI & MARCELLI, 2007).

O estudo dos mecanismos envolvidos com a resistência é de importância, assim como o desenvolvimento de metodologias de elevada acurácia para o diagnóstico da TB resistente, que possam também ser aplicadas em condições de rotina, nos locais onde a taxa de resistência é mais prevalente. Apesar de existirem testes moleculares comerciais disponíveis fabricados em outros países, o seu emprego pela rede de saúde pública é dificultado por questões de custo e falta de validação.

A RMP está, na maioria das vezes, associada à resistência à INH. Por esse motivo, pode ser utilizada como um possível marcador de TB-MDR (CAWS *et al.*, 2006; TORTOLI, *et al.*, 2007). Seu mecanismo de ação é conhecido e a detecção da resistência, através de técnicas de biologia molecular, é menos complexa que a de outros fármacos, pois mais de 95% das amostras resistentes à RMP estão associadas com mutações na região hipervariável do gene *rpoB* (TELENTI *et al.*, 1997; MANI *et al.*, 2001; CAVUSOGLU *et al.*, 2002; BROSSIER *et al.*, 2006).

Considerando os aspectos citados acima, este estudo teve como objetivo desenvolver e padronizar um teste de diagnóstico para detecção de TB resistente à RMP, utilizando uma metodologia molecular de execução rápida e simples.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tuberculose – magnitude da doença

Historicamente, a TB constituiu um inusitado fenômeno de interpenetração cultural com diversas formas de manifestação humana, por ter vitimado cientistas, literatos, poetas, músicos, pintores e monarcas, interferindo inclusive no curso político de países. Com o advento da moderna quimioterapia sucedeu uma notável revolução nesta doença. O maior impacto foi nos países desenvolvidos, chegando ao limiar de sua eliminação. Nos países em desenvolvimento o efeito, embora significativo, foi bem menor, pois a doença continua sendo um sério problema de saúde pública (ROSEMBERG, 1999).

A TB, vitimando todas as camadas sociais, sempre atingiu mais expressivamente os seguimentos pobres, e hoje, no contexto mundial, ocorre essencialmente, nos países em desenvolvimento, com 80% dos casos ocorrendo na Ásia e na África (ZAGER & MCNERNEY, 2008). A doença representa um sério problema de saúde pública, envolvendo aspectos sociais e econômicos para o Brasil e o mundo. Atualmente, um terço da população mundial está latentemente infectada pelo bacilo da TB e 10% destas pessoas irão desenvolver a doença ativa em algum momento da sua vida (WHO, 2008). Apesar dos procedimentos para seu controle e dos regimes terapêuticos usados, existem problemas inerentes à doença que incluem o surgimento de linhagens resistentes aos fármacos usados no tratamento, a alta correlação da incidência da doença em populações pobres e, mais recentemente, a imunodepressão causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), criando as condições ideais para a transformação da TB em uma doença oportunista (BRASIL, 2002; WELLS, *et al.*, 2007).

Apesar dos esforços empreendidos mundialmente, a TB constitui-se, ainda, uma importante ameaça para a saúde pública. Os avanços no seu conhecimento e na tecnologia disponível para controlá-la não têm sido suficientes para impactarem significativamente em sua morbi/mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento.

2.1.1 Epidemiologia

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 1/3 da população mundial está infectada com *M. tuberculosis*. Em 2006, surgiram no mundo 9,2 milhões de casos novos de TB, com uma prevalência de mais de 14 milhões e quase 1,7 milhões de mortes. As maiores taxas de incidência e mortalidade, respectivamente, foram observadas na África: 343/100.000 e 74/100.000 habitantes (WHO, 2008). Também em 2006, foram estimados 0,5 milhões de casos de TB-MDR. O país com maior número de casos de TB é a Índia, seguido pela China, Indonésia, África do Sul e Nigéria (WHO, 2008).

No Brasil, em 2006, foram notificados, aproximadamente, 94.000 casos novos de TB, correspondendo a um coeficiente de incidência de 50/100.000 habitantes e uma taxa de mortalidade de 4.0/100.000 habitantes. O Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países que são responsáveis por 80% de todos os casos estimados de TB no mundo e, junto com o Peru, respondem por 50% dos casos de TB nas Américas. (WHO, 2008).

No Rio Grande do Sul, em 2006, foram notificados 5.176 casos novos de TB, com incidência de 47/100.000 habitantes. Em Porto Alegre, capital do Rio Grande do Sul, a incidência de TB é em torno de 112/100.000 habitantes, o que representa aproximadamente 1.300 casos novos por ano, sendo em torno de 26% destes pacientes co-infectados com o vírus HIV (SES-RS, 2007).

2.1.2 Etiologia - *Mycobacterium tuberculosis*

O principal agente etiológico da TB é *M. tuberculosis*, também chamado de Bacilo de Koch (BK). É uma micobactéria pertencente à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium*. O gênero *Mycobacterium* compreende cerca de 100 espécies, a maioria saprófitas de vida livre (ARANAZ, 1999). As espécies que constituem o complexo *Mycobacterium tuberculosis* causam tuberculose humana e animal, são elas: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium bovis* e

Mycobacterium microti., além da linhagem vacinal *M. bovis* BCG. Dois novos táxons foram incluídos como sub-espécies dentro deste complexo: *M. tuberculosis* subsp. *canetti*, isolado na África e Europa (BARNES *et al.*, 1991) e *M. tuberculosis* subsp. *caprae* isolada, principalmente, de caprinos (BRAGA *et al.*, 1999).

As bactérias que compõem este gênero, apesar de serem diferentes em relação à morfologia das colônias e às propriedades bioquímicas, possuem características taxonômicas comuns, como a presença de ácidos graxos de cadeia longa C₆₀-C₉₀ (ácidos micólicos), o DNA com 61% a 71% de teor de guanina e citosina (G+C), e álcool-ácido resistência quando expostas a coloração tintorial pelo método de Ziehl-Neelsen (GOODFELLOW & MAGEE, 1998). O conteúdo de G + C é constante em todo o seu genoma, indicando provável ausência de transferência horizontal de genes envolvidos com a patogenicidade (COLE *et al.*, 1998).

Uma característica amplamente estudada do complexo *M. tuberculosis* é a presença e distribuição de seqüências ricas em DNA repetitivo, chamadas seqüências de inserção (IS). O elemento IS6110, membro da família IS3, não é somente o mais abundante como também é o melhor caracterizado, sendo que o número de cópias varia de linhagem para linhagem.

Várias características da espécie *M. tuberculosis* explicam muitas das questões da história natural da doença. O bacilo é classificado como aeróbico estrito, parasita intracelular facultativo, causador de patogenia intracelular, não formador de esporos nem de cápsulas, sem flagelos (imóvel) e não produtor de toxinas. O envelope celular é complexo e serve de proteção à ação de agentes químicos, mas pode sofrer ação dos agentes físicos, como calor, luz solar e radiação ultravioleta. Fora do parasitismo, o bacilo só consegue sobreviver no meio externo por algumas horas (BRENNAN & NIKAIDO, 1995; METCHOCK *et al.*, 1999).

O tempo de geração de *M. tuberculosis* em meio sintético ou em animais infectados é de, aproximadamente, 20 horas. Isto contribui com a natureza crônica da doença e impõe prolongados regimes terapêuticos, o que dificulta a adesão ao tratamento dos pacientes portadores de TB ativa ou latente. Esta característica

determina a reação inflamatória localizada (nódulo ou granuloma) e necrose tecidual (lesão cavitária) (FUCHS & WANNMACHER, 1992).

As micobactérias podem entrar em um estado de dormência, no qual sobrevivem sem se dividir. Esta propriedade tem um importante significado clínico, já que a TB muitas vezes representa a reativação de uma infecção antiga, sub-clínica, ocorrida vários anos antes. A dormência permite que as bactérias permaneçam em pequenos grupos populacionais, dificultando de uma maneira geral a erradicação da doença (COLSTON & COX, 1999).

2.1.3 Transmissão

A TB é transmitida de pessoa a pessoa e a principal porta de entrada do bacilo é a via respiratória. Os doentes com a forma pulmonar bacilífera constituem a principal fonte de disseminação da doença, pois através da tosse e/ou espirro eliminam gotículas e partículas (núcleo de Wells) de até 10 μm de diâmetro, contendo de 2 a 10 bacilos. Um paciente pulmonar bacilífero, se não tratado pode infectar de 10 a 15 pessoas em um ano. As partículas são estáveis e, quando eliminadas, ficam em suspensão por várias horas, podendo chegar aos alvéolos pulmonares, onde se multiplicam (BATES, 1980; STEAD & DUTT, 1989).

Os fatores que determinam a probabilidade de transmissão da doença estão relacionados com: (i) as características das fontes de infecção, que são os indivíduos com doença pulmonar (bacilíferos) e seus contatos (pessoas que coabitam com o doente), levando-se em consideração que a concentração de bacilos eliminada por uma pessoa é estimada em 10^2 a 10^4 de lesões nodulares, mas pode chegar a 10^7 a 10^8 de lesões cavitárias (CANETTI *et al.*, 1965); (ii) o ambiente e a maneira como ocorrem suas relações, ou seja, a concentração de bacilos no ar, determinada pelo volume do ambiente e sua ventilação; (iii) o tempo de exposição; e (iv) a condição imune da pessoa exposta (SMITH & MOSS, 1994). A descoberta precoce dos doentes bacilíferos entre os sintomáticos respiratórios e outros grupos de risco e a introdução de um tratamento antimicrobiano eficaz, além de curar o doente, reduzem a capacidade de transmissão e, assim,

proporciona a quebra da cadeia epidemiológica da doença (TRUJILLO & KRITSKI, 2001; ATS, 2000).

Indivíduos imunocompetentes infectados com *M. tuberculosis* têm, aproximadamente, 10% de risco de desenvolver a doença durante toda a vida. As pessoas infectadas com o vírus do HIV possuem 10% de chance, a cada ano, de desenvolver TB após contato com *M. tuberculosis* (GOOZÉ, L. & DALEY, C. L., 1997).

2.2 Tratamento da TB

A quimioterapia é fundamental no controle da doença, pois interrompe a cadeia de transmissão, que são os pacientes bacilíferos. No entanto, é necessário que os fármacos sejam utilizados em esquemas terapêuticos padronizados: (i) administrados em combinação de, pelo menos, três fármacos, com ação sobre diferentes sítios de lesão e sobre diferentes fases do metabolismo bacteriano, para prevenir o desenvolvimento de resistência; (ii) prescritos corretamente e por tempo prolongado de tratamento, visando atingir os bacilos de crescimento lento e intermitente; e (iii) administrados regularmente para manter as concentrações necessárias sobre a população bacilar (BRASIL, 1995; IUATLD, 2000).

Fatores como o lento crescimento de *M. tuberculosis*, causado pelo tempo prolongado para multiplicar-se (em torno de 20 horas), sua atividade metabólica e a localização celular, determinam que o tempo necessário para a quimioterapia seja prolongado. A população micobacteriana patogênica pode ser dividida em quatro subpopulações: (i) com metabolismo ativo e crescimento rápido, em ambiente aeróbio; (ii) com metabolismo semidormente em ambiente intracelular ácido (lisossomo), onde há uma baixa concentração de oxigênio; (iii) com metabolismo semidormente em ambiente intracelular não ácido (citoplasma); e (iv) com metabolismo extracelular dormente. Esta última apresenta uma propriedade única da infecção micobacteriana, onde o microorganismo é capaz de sobreviver quiescente por anos ou décadas (MITCHISON *et al.*, 1985; GILLESPIE *et al.*, 2002).

2.2.1 Fármacos anti-TB

O avanço mais importante no combate a TB ocorreu na década de 1940, com o surgimento de antibióticos e quimioterápicos, trazendo a cura nos anos seguintes. A estreptomicina (SM), introduzida em 1944, a INH empregada a partir de 1952, a pirazinamida (PZA) em 1955 e a RMP introduzida em 1966, foram fundamentais para isso (ISEMAN *et al.*, 1994; BLANCHARD *et al.*, 1996).

Os fármacos eficazes contra micobactérias podem ser divididos em duas categorias: (i) fármacos de amplo espectro que têm atividade contra micobactérias e muitas outras espécies bacterianas: cicloserina, fluoroquinolonas, macrolídeos, rifamicinas, estreptomicinas; (ii) fármacos que têm espectro específico, com atividade restrita a micobactérias, ou mesmo a apenas espécies micobacterianas: etionamida (ETH), INH, PAS, etambutol (EMB), pirazinamida (PZA), tiacetazona (TZ), e clofazimina (CFZ). As bases do mecanismo para essa divisão podem ser explicadas assumindo que os fármacos da primeira categoria interagem com alvos moleculares encontrados em um amplo espectro de bactérias, incluindo as micobactérias. Em contraste, os fármacos com espectro micobacteriano podem interagir com alvos presentes apenas nestes organismos. A atividade específica antimicobacteriana pode também resultar da conversão do fármaco inativo por mecanismos específicos das micobactérias (CHOPRA & BRENNAN, 1998).

Em 1979, a Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária/Ministério da Saúde (DNPS/MS) normatizou para todo o país um Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) tendo como base fundamental o tratamento quimioterápico, com um esquema de primeira linha, chamado Esquema 1 (E-1) ou RHZ de curta duração: RMP, INH e PZA por 2 meses, seguidos de RMP e INH por 4 meses. O E-1 é indicado para todas as formas de TB sem uso prévio de medicação e, para o retratamento, nos casos de recidiva após cura, desde que estes pacientes tenham tido alta há mais de cinco anos (BRASIL, 2002b). Para pacientes que se tornaram positivos após abandonar o tratamento inicial com E-1 ou apresentarem recidiva após cura (período menor que 5 anos) com E-1, utiliza-se esquema 1 reforçado com EMB (BRASIL, 2002).

Para TB extrapulmonar, na forma meningoencefálica, é recomendada uma terapia mais prolongada, esquema 2 (E-2), o qual é constituído pelo uso de RMP, INH e PZA por dois meses, seguidos de RMP e INH por sete meses (BRASIL, 2002) (tabela 1).

Tabela 1. Esquemas de tratamento da TB utilizados no Brasil desde 1979

Esquemas de Tratamento da TB		
Sem tratamento anterior		
casos novos de todas as formas exceto meningoencefalite	Esquema 1	2 meses: RMP / INH / PZA 4 meses: RMP / INH
Com tratamento anterior		
casos de retratamento em recidivas ou retorno após abandono do E-1	Esquema 1 Reforçado	2 meses: RMP / INH / PZA 4 meses: RMP / INH / EMB
Meningoencefalite tuberculosa	Esquema 2	2 meses: RMP / INH / PZA 7 meses: RMP / INH
Falência do E-1, E-1 R ou E-2	Esquema 3	3 meses: SM / ETH / PZA 9 meses: ETH / EMB

(Adaptado de BRASIL, 2002).

Os fármacos como etionamida, cicloserina, ácido para-aminosalicílico, tiacetazona, canamicina, capreomicina, viomicina, amicacina e fluoroquinolonas são utilizados como agentes secundários ou alternativos para tratar infecções causadas por linhagens resistentes aos fármacos comumente utilizados (RAMASWAMY & MUSSER, 1998).

2.3 Tuberculose Resistente

A resistência do BK aos fármacos é tão antiga quanto o seu tratamento medicamentoso (aproximadamente, 60 anos). Essa resistência é decorrente da pressão seletiva exercida pelo uso dos fármacos sobre a população de bacilos que se apresentam mutados espontaneamente para cada fármaco (CANETTI, 1965; HORSBURGH *et al.*, 2000). A resistência é um fenômeno fundamentalmente ligado às grandes populações bacterianas. Na TB humana, as maiores populações

estão localizadas nas lesões cavitárias e há mais de meio século sabemos ser a resistência mais freqüente durante o tratamento de formas cavitárias, quando comparadas com as formas não-cavitárias (CANETTI, 1965, BEN-DOV & MASON 1987).

2.3.1 Fatores associados com o desenvolvimento da resistência

Os fatores que afetam negativamente o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) incluem a deficiência na implantação e manutenção de um esquema terapêutico padronizado e a escassez no fornecimento dos fármacos em áreas com recursos inadequados. A instabilidade política e o uso de fármacos de baixa qualidade são preocupações adicionais. O desenvolvimento da resistência pode ser, também, devido a uma escolha inapropriada do esquema terapêutico, algumas vezes por desconhecimento de um tratamento anterior, ausência de esquemas terapêuticos padronizados e erros, como a prescrição de um único fármaco (WHO *et al.*, 1997; ESPINAL *et al.*, 2001; BLOWER *et al.*, 2004). Outro fator importante é a não adesão do paciente ao tratamento prescrito, o que, freqüentemente, é uma fonte de isolados resistentes às drogas. O tratamento tem uma duração de seis meses, considerado longo se comparado com o tratamento de outras infecções bacterianas e possui muitos efeitos adversos (ZHANG *et al.*, 2005).

2.3.2 Mecanismos de resistência aos fármacos em *M. tuberculosis*

As bactérias podem utilizar diferentes estratégias para desenvolver resistência aos antimicrobianos. De um modo geral, esses mecanismos de defesa podem ser divididos em três grupos: (i) mecanismos de barreira (redução da permeabilidade da parede celular e bombas de efluxo); (ii) degradação ou inativação de enzimas (β -lactamases); (iii) modificação do alvo do fármaco (mutação de um gene alvo) (ZHANG & TELENTI, 2000). A resistência pode ser classificada em adquirida ou primária. A resistência adquirida, também conhecida como secundária, consiste na utilização incorreta dos fármacos e subsequente

seleção e multiplicação de linhagens resistentes a um ou mais fármacos. Já a resistência primária consiste nas situações em que indivíduos sadios se infectam com o bacilo já resistente (BRASIL, 1992).

Diferente do que acontece em muitas bactérias, com *M. tuberculosis* não há indicação de uma transferência horizontal de genes, isto é, aquisição de resistência através de elementos móveis. A resistência apresentada por *M. tuberculosis* aos fármacos anti-TB é uma amplificação artificial do fenômeno natural de mutações espontâneas. Assim, a resistência ocorre, principalmente, através de mutações cromossomais, que são alterações na seqüência do DNA bacteriano que se refletem nas proteínas envolvidas com a ligação aos fármacos ou ativação destes. (GILLESPIE, 2002).

A resistência ocorre primeiro a uma droga do esquema, seguindo-se o desenvolvimento de resistência à outra, produzindo a TB-MDR. Esse estado reflete a acumulação de etapas de mutações individuais de diversos genes independentes, e não a aquisição em bloco de resistência a múltiplas drogas (BARROSO *et al.*, 2003). O elemento crucial no surgimento de linhagens resistentes é a ausência de um sistema organizado para assegurar um rápido diagnóstico, um tratamento eficiente e uma supervisão dos casos de TB. Por essa razão, o nível de resistência aos fármacos anti-TB em uma população é um bom indicador do programa nacional de controle da doença (WHO, 1997).

2.3.3 TB-MDR

A forma de TB com bacilos resistentes à RMP e INH foi conceitualmente denominada MDR-TB nos EUA e, universalmente aceita a partir da adoção deste conceito pelo Centers of Disease Control (CDC) em 1992. No Brasil, de acordo com o I Consenso Nacional em Tuberculose (1997) e o Manual de Normas para o Controle da Tuberculose (2000), considera-se um caso resistente a múltiplos fármacos (TBMR), além do aspecto bacteriológico, o aspecto operacional do controle da doença, pois existe um esquema de reserva para o retratamento de casos (E-1R). A variável bacteriológica consiste na resistência *in vitro* à INH e RMP e a outro fármaco, PZA, EMB e/ou SM. O aspecto operacional diz respeito

aos casos de falência aos esquemas padronizados, E-1 e E-3 (DALCOLMO *et al.*, 1999; FORTES & DALCOLMO, 1997). Quando essa situação acontece, são indicados esquemas especiais com fármacos de segunda linha, sob os cuidados de um sistema de Vigilância Epidemiológica da TB MDR (BRASIL, 2002).

2.3.4 Inquéritos de resistência

O primeiro inquérito mundial de resistência ocorreu entre 1994 e 1997. O Brasil participou desse inquérito mundial com uma amostra representativa de 5.138 isolados, provindos de pacientes atendidos ambulatorialmente, sendo 866 com tratamento anterior para TB e 4.272 sem tratamento prévio. Considerando cada fármaco isoladamente, a taxa de resistência primária foi de 8,5% (INH 4,4%, RMP 1,3%, EMB 0,1% e SM 0,2%), enquanto que, para a associação INH + RMP foi de 0,7%. A taxa de resistência adquirida foi de 21,0% (INH 11,3%, RMP 6,6%, EMB 0,1% e SM 0,8%) e para a associação INH + RMP foi de 5,9% (Tabela 2) (BRAGA, *et al.*, 2003).

Foi observada a diferença entre as taxas de resistência combinada (primária + adquirida) e de resistência a múltiplos fármacos (INH + RMP e/ou EMB, SM) entre os pacientes não tratados previamente (1,1%) e os já tratados (7,9%), mostrando a importância do uso prévio dos fármacos no desenvolvimento da resistência (WHO, 1997; PABLOS-MENDEZ *et al.*, 1998). Nesse estudo, quando analisadas as regiões geográficas do Brasil, as taxas de resistência primária foram de 10,6%, 6,3%, 9,9%, 9,3% e 9,2% para Norte, Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul, respectivamente (BRAGA *et al.*, 2003).

O segundo estudo global de resistência foi realizado entre 1996 e 1999, com 58 áreas geográficas, completando assim uma cobertura mundial de 33% da população e de 28% dos casos de TB (WHO, 2000). Os resultados mostraram o problema da TB-MDR no mundo: Estônia (14,1%), Província de Henan, China (10,8%), Letônia (9,0%), Ivanovo Oblast, (9,0%), Tomsk Oblast, Rússia (6,5%), República Islâmica do Iran (5,0%), Província de Zhejiang, China (4,4%), Moçambique (3,5%) e Tamil Nadu State, Índia (3,4%).

Tabela 2. Inquérito de Prevalência de Resistência no Brasil entre 1995 e 1997.

	Resistência Primária		Resistência Adquirida		Resistência Combinada	
	nº	%	nº	%	nº	%
PACIENTES ESTUDADOS	4.272	83,1	866	16,9	5.138	100,0
PACIENTES SUSCETÍVEIS	3908	91,5	684	79,0	4592	89,4
QUALQUER RESISTÊNCIA	364	8,5	182	21,0	546	10,6
ISONIAZIDA (INH)	10	4,4	16	11,3	26	7,0
RIFAMPICINA (RMP)	3	1,3	9	6,6	12	3,3
ETAMBUTOL (EMB)	2	0,1	1	0,1	3	0,1
ESTREPTOMICINA (SM)	8	0,2	6	0,8	14	0,3
MONORESISTÊNCIA	269	6,3	93	10,7	362	7,0
ISONIAZIDA (INH)	158	3,7	57	6,6	215	4,2
RIFAMPICINA (RMP)	8	0,2	10	1,2	18	0,4
ETAMBUTOL (EMB)	3	0,1	1	0,1	4	0,1
ESTREPTOMICINA (SM)	100	2,3	25	2,9	125	2,4
MULTIRESISTÊNCIA	45	1,1	68	7,9	113	2,2
INH+RMP	31	0,7	51	5,9	82	1,6
INH+RMP+EMB	1	0,0	1	0,1	2	0,0
INH+RMP+SM	11	0,3	15	1,7	26	0,5
INH+RMP+EMB+SM	2	0,1	1	0,1	3	0,1
OUTROS PADRÕES	50	1,2	21	2,4	71	1,4
INH+EMB	3	0,1	1	0,1	4	0,1
INH+SM	45	1,1	20	2,3	65	1,3
INH+EMB+SM	1	0,0	0	0,0	1	0,0

(Adaptado de BRAGA *et al.*, 2003)

Na terceira fase do projeto foram avaliados 77 regiões ou países, entre os anos de 1999 e 2002, representando 20% do total global de casos novos com baciloscopia positiva. Foram incluídas 39 regiões não estudadas previamente e observou-se que a prevalência de resistência a pelo menos um antibiótico variou de 0% em alguns países da Europa Ocidental a 57,1% no Cazaquistão (média = 10,2%). A média de prevalência de resistência aos fármacos específicos foi 6,3% para SM, 5,9% para INH, 1,4% para RMP e 0,8% para EMB (WHO, 2004). A prevalência de MDR variou de 0% em oito países a 14,2% no Cazaquistão

(51/359) e em Israel (36/253). As maiores prevalências foram observadas em Tomsk, Rússia (13,7%), Karakalpakstan, Uzbequistão (13,2%), Estônia (12,2%), Província de Liaoning, China (10,4%), Lituânia (9,4%), Letônia (9,3%), Província de Henan, China (7,8%) e Equador (6,6%) (WHO, 2004). As causas do aumento da prevalência de resistência podem ser: (i) políticas inadequadas de controle da TB, (ii) imigração de pacientes de áreas com resistência elevada, (iii) epidemias de TB resistente.

Até o momento, os estudos globais de resistência (de 1994 a 2002), abrangeram cerca de um terço dos casos notificados de TB no mundo. Entretanto, grandes lacunas ainda são encontradas em áreas cruciais, que necessitam ser estudadas, como China, Índia e países da antiga União Soviética. (WHO, 2004). Em vários locais, novos estudos estão sendo realizados. O Brasil, que participou do primeiro inquérito, brevemente repetirá a pesquisa, com amostragem de novos casos e de casos de retratamento, sendo que, pacientes com TB e HIV também serão incluídos.

Além disso, o problema recentemente introduzido da TB-XDR complicam o controle da doença a nível mundial. TB-XDR, é a TB-MDR com resistência adicional a qualquer fluoroquinolona, e a pelo menos, uma das três drogas injetáveis capreomicina, canamicina e amicacina utilizadas no tratamento da TB (http://www.who.int/tb/xdr/taskforcereport_oct06.pdf). A TB-XDR agora constitui uma ameaça emergente para o controle da TB e para disseminação da resistência, especialmente em doentes infectados com HIV, como foi recentemente reportado (GANDHI, 2006; MIGLIORI *et al.*, 2008). Por todos esses motivos, a detecção rápida da resistência aos fármacos, tanto de primeira como de segunda linha tornou-se um elemento fundamental nos programas de controle da TB. Na figura 1 os pontos vermelhos indicam os países com casos confirmados de TB-XDR no mundo.

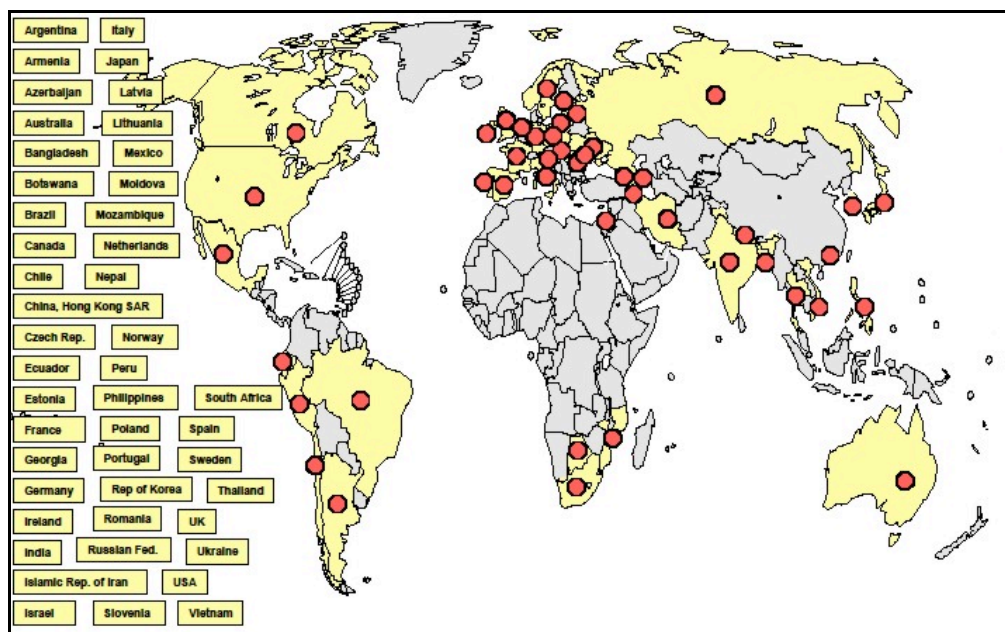


Figura 1. Países com casos confirmados de TB-XDR no mundo – Fevereiro/2008 (www.who.int/tb).

2.3.5 Mecanismo de ação e resistência aos principais fármacos anti-TB

Os determinantes genéticos e os mecanismos de resistência aos fármacos apresentados por *M. tuberculosis* vêm sendo estudados na busca de explicações para entender o surgimento da resistência e desenvolver metodologias que identifiquem mais rapidamente a ocorrência de mutações (ZHANG & TELENTI, 2000; TAKIFF, 2000; ROSSETTI *et al.*, 2002; GILLESPIE, 2002; CUNHA & FROTA, 2005; DALLA COSTA, 2008).

Isoniazida

A INH é ativa somente frente aos bacilos em replicação ativa, ela é uma pró-droga que requer a ativação pela enzima catalase-peroxidase da bactéria para gerar vários radicais reativos, que então atuam em diversos alvos no bacilo. O alvo mais conhecido é a via de síntese do ácido micólico da parede celular, onde, pelo menos, duas enzimas enoil-ACP redutase (InhA) e β -cetoacil ACP sintetase (KasA) têm sido identificadas como alvo da inibição pela INH (ZHANG, 2005).

A INH tem múltiplos efeitos no bacilo da TB e não é tarefa simples localizar com precisão qual é o alvo mais essencial, cuja inibição levará à morte da célula (ZHANG & TELENTI, 2000).

A resistência à INH parece estar associada a uma variedade de mutações que afetam um ou mais genes, como os que codificam a enzima KatG (ZHANG *et al.*, 1992), a enzima InhA, envolvida na biossíntese do ácido micólico (BANERJEE, *et al.*, 1994) e a alkyl hidroperóxido redutase (AhpC), envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo (WILSON & COLLINS, 1996).

Os mecanismos genéticos determinantes da resistência à INH parecem ocorrer em diferentes níveis: (i) bloqueio da ativação do fármaco, relacionado com o gene *katG*, (ii) inativação do intermediário tóxico da INH, atividade associada com o gene *ahpC*, (iii) bloqueio da biossíntese dos ácidos micólicos (*inhA* e *mabA*) (ZHANG & TELENTI, 2000).

Estudos realizados no Brasil (SILVA *et al.*, 2003; DALLA COSTA, 2008) mostraram que 75% dos isolados estudados apresentaram mutações no gene *katG*, sendo o códon 315 o mais freqüente. Na região promotora do gene *ahpC*, as mutações ocorreram em 14% dos isolados. Para o gene *inhA*, apenas 1% dos isolados apresentaram mutações. Também foi observado que 6,2% dos isolados apresentaram mutações nos genes *katG* e *ahpC* simultaneamente.

Etambutol

O EMB inibe a biossíntese da parede micobacteriana e é ativo somente contra bactérias em multiplicação ativa. Esse fármaco interfere na biossíntese de lipoarabinomanano e arabinogalactano (importantes polissacarídeos da parede celular micobacteriana). Ele atua inibindo a associação das arabinotransferases com a membrana, causando o acúmulo de ácidos micólicos e a morte da célula (RAMASWAMY, & MUSSER, 1998; COLL, 2003).

Mutações no gene *embB* podem ser identificadas em 47 a 69% das linhagens de *M. tuberculosis* resistentes ao EMB e estão associadas a altos níveis de resistência (CMI \geq 20 μ g/mL) (CUNHA & FROTA, 2005). Baixos níveis de resistência, encontrados em 35% das linhagens de *M. tuberculosis* não apresentam mutações no gene *embB* (ZHANG & TELENTI, 2000).

Na maioria dos casos, a resistência ao EMB também está associada com resistência a outras drogas anti-TB. Um estudo realizado com 74 linhagens de *M. tuberculosis* da China, revelou que a presença de mutações no gene *embB* não estavam relacionadas com resistência somente ao EMB, mas estavam associadas

com a resistência a múltiplas drogas, especialmente resistência tanto ao EMB quanto à RMP (SHI *et al.*, 2007).

Pirazinamida

A PZA é um análogo estrutural da nicotidamida, tem a habilidade de inibir a população de bacilos semi-dormentes residindo num meio ácido, que não são efetivamente mortos por outro fármaco antimicrobiano. Por este fármaco possuir atividade frente a bacilos semi-dormentes, a adição deste no esquema de tratamento da TB fez com que o tratamento fosse reduzido de 9 para 6 meses (SCORPIO *et al.*, 1997).

Sua atividade, *in vivo*, é em meio ácido (pH = 5,5) e, por isso, tem ação sobre os bacilos de *M. tuberculosis* semi-dormentes localizados nos focos inflamatórios no interior dos macrófagos (MITCHISON, 1985). A PZA é um pró-fármaco e é convertido em sua forma ativa, o ácido pirazinóico (POA), pela enzima micobacteriana pirazinamidase (Pzase). A PZA se difunde para o interior do macrófago, onde se converte em ácido pirazinóico, que se acumula no interior da célula, pois *M. tuberculosis* tem um sistema de efluxo deficiente para o ácido pirazinóico. Este atua sobre a enzima-alvo, FAS I (*Fatty Acid Synthetase I*), inibindo a síntese de ácidos graxos, pois acidifica o pH intracelular abaixo do tolerado pela enzima (COLL, 2003).

Mutações no gene que codifica a PZase (*pncA*) são, em grande parte, responsáveis pelo mecanismo de resistência a PZA, ocorrendo em 72 a 97% das linhagens resistentes (COLL, 2003; RODRIGUES, *et al.*, 2005).

Estreptomicina

A SM é um aminoglicosídeo que interfere na síntese protéica, bloqueando a tradução de RNA mensageiro. O local de sua ação é na subunidade menor do ribossomo (30S), especificamente na proteína S12 e no RNA ribossômico (rRNA) de 16S. Ela bloqueia a tradução do RNA mensageiro (mRNA) em seu início, tanto na incorporação de novos aminoácidos na cadeia polipeptídica como na facilitação de uma revisão ineficiente pelo ribossomo (SANDER & BÖTTGER, 1999; ZHANG & TELENTI, 2000).

O principal sítio de mutação é o gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossomal S12, em que ocorrem mutações resultando na substituição de um

único aminoácido. Um segundo mecanismo da resistência ocorre por alterações no gene que codifica o rRNA 16S (*rrs*) (FINKEN *et al.*, 1993). Recentemente, um novo gene *gidB*, que codifica uma enzima conservada 7-methylguanosine (m738 G) metiltransferase específica para o 16S rRNA, foi descrita por conferir baixo nível de resistência à SM (OKAMOTO *et al.*, 2007; SPIES *et al.*, 2008).

O resumo do mecanismo de ação, alvos e genes envolvidos na resistência dos das principais fármacos utilizados no tratamento da TB pode ser visualizado na tabela 3.

Tabela 3. Mecanismo de ação, genes envolvidos na resistência, e alvos dos principais fármacos utilizados no tratamento da TB.

Droga (ano de descobrimento)	Mecanismo de ação	Alvos	Genes envolvidos na resistência
Estreptomicina (1944)	Inibição da síntese protéica	Proteína ribossomal S12 e rRNA 16S	<i>rpsL</i> <i>rrs</i>
Isoniazida (1952)	Inibição da síntese de ácidos micólicos da parede celular e outros múltiplos efeitos no DNA, lipídeos, carboidratos e metabolismo de NAD	Múltiplos alvos	<i>katG</i> <i>inhA/mabA</i> <i>ahpC</i> <i>oxyR</i>
Rifampicina (1966)	Inibição da síntese de RNA	Subunidade β da RNA polimerase	<i>rpoB</i>
Pirazinamida (1952)	Rompimento do transporte da membrana e depleção da energia	Metabolismo de energia da membrana	<i>pncA</i> + ?
Etambutol (1961)	Inibição da síntese de arabinogalactano da parede celular	Arabinosyl transferase	<i>embCAB</i>

Adaptado de ZHANG, (2005) e DROBNIEWSKI *et al.* (2007).

2.4 RIFAMPICINA:

Estruturalmente, a RMP consiste de um cromóforo naftoquinômico que alcança a cadeia alifática entre o nitrogênio no C₂ e o oxigênio no C₁₂ (figura 2). É um derivado do 3,4-(metilpiperazinil-iminometilidina)-rifampicina e foi introduzido como potente agente anti-TB em 1972 (LAL & LAL, 1994). Tem atividade contra

uma ampla variedade de bactérias álcool-ácido resistentes e várias outras micobactérias de crescimento lento como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium haemophilum* e *Mycobacterium marinum*. Tem atividade variável contra o complexo *Mycobacterium avium* (MAC), sendo inativa nas micobactérias de crescimento rápido. É bactericida para microorganismos extracelulares e intracelulares devido a sua lipossolubilidade (GILMAN, 1990).

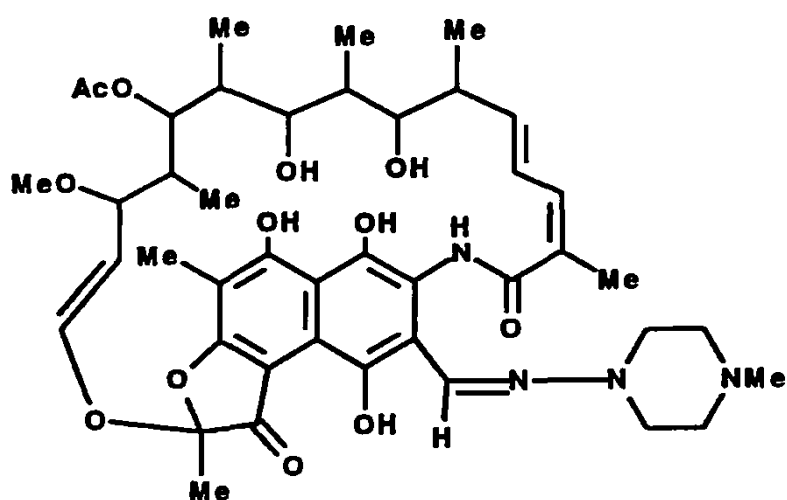


Figura 2. Ilustração da estrutura molecular da rifampicina (CHOPRA & BRENNAN, 1998).

Tem ação bactericida eficiente contra *M. tuberculosis*, sendo um dos componentes chave no tratamento. As concentrações próximas de 0,5 µg/ml de RMP são bactericidas para os isolados sensíveis de *M. tuberculosis*, tendo ação intracelular no bacilo que está se replicando lentamente na lesão caseosa, bem como no bacilo que está em replicação ativa em cavidades pulmonares abertas (INDERLIED, 1994). As reações adversas causadas pelo fármaco são reações gastrointestinais e de hipersensibilidade. Entretanto, o maior efeito é a hepatotoxicidade e a pigmentação da urina, lágrima e outros fluídos corporais. A RMP também induz um aumento do metabolismo hepático de uma ampla variedade de fármacos (MANDELL *et al.*, 1995).

Os inibidores de proteases, usados para combater o HIV, interagem com a RMP de duas distintas maneiras: (i) a RMP induz as citocromo oxidases no

citocromo P450, aumentando o metabolismo dos fármacos inibidores de proteases, levando-os a níveis subterapêuticos, (ii) e os inibidores de proteases por sua vez aumentam o nível sérico da RMP, aumentando a toxicidade deste fármaco (CDC, 1996).

2.4.1 Mecanismo de ação da RMP em *M. tuberculosis*

A RMP inibe a RNA polimerase (RNAP) procariótica, dependente de DNA, por ligar-se à subunidade β no presumido centro catalítico da enzima, impedindo a iniciação da transcrição. A subunidade β deve estar complexada com o trímero $\alpha_2\beta'$ para que ocorra a incorporação correta de nucleotídeos e os RNAs possam ser sintetizados. Com a ligação da RMP, o complexo fármaco-subunidade β é formado, abortando então a síntese de RNAs e, conseqüentemente, os processos de tradução. A RNA polimerase de mamíferos é inibida pela RMP apenas em concentrações significativamente altas (GILMAN, 1990).

2.4.2 Mecanismo de resistência de *M. tuberculosis* à RMP.

A partir de informações sobre a RNA polimerase de *Escherichia coli* buscou-se caracterizar o gene *rpoB* de *M. tuberculosis*. A resistência à RMP neste organismo também se mostrou relacionada com modificações na estrutura da subunidade β da RNA polimerase procariótica (JIN & GROSS, 1988; TELENTI *et al.*, 1993b; LAL & LAL, 1994).

TELENTI *et al.* (1993b) foram os primeiros a demonstrar que a resistência à RMP, na maioria das linhagens, ocorria devido a mutações *missense* (substituição do aminoácido pela troca de uma ou de duas bases) ou a pequenas deleções ou inserções, dentro de uma região de 81 pb conhecida como *Rifampin-Resistance-Determining Region* (RRDR) do gene *rpoB*, correspondendo aos códons Gly507 a Leu533, codificantes de 27 aminoácidos. Esta região está próxima da região central do gene *rpoB*, composto por 5000 pb. As mutações, dentro do gene *rpoB*, foram detectadas pela técnica de amplificação por PCR de uma região de 157

pares de bases (pb), onde está a maioria dos sítios de mutação (TELENTI *et al.*, 1993a; WILLIAMS *et al.*, 1994; RAMASWAMY & MUSSER, 1998).

A figura 3 mostra os aminoácidos substituídos nos códons 509 a 533 da subunidade β da RNAP de *M. tuberculosis*. As posições dos aminoácidos substituídos devido às mutações de ponto são mostradas nas caixas abaixo da seqüência. As posições dos aminoácidos substituídos ou ausentes devido a inserções ou mutações são mostradas nas caixas acima da seqüência. A numeração dos códons segue a padronização para *E. coli* (WILLIAMS *et al.*, 1994).

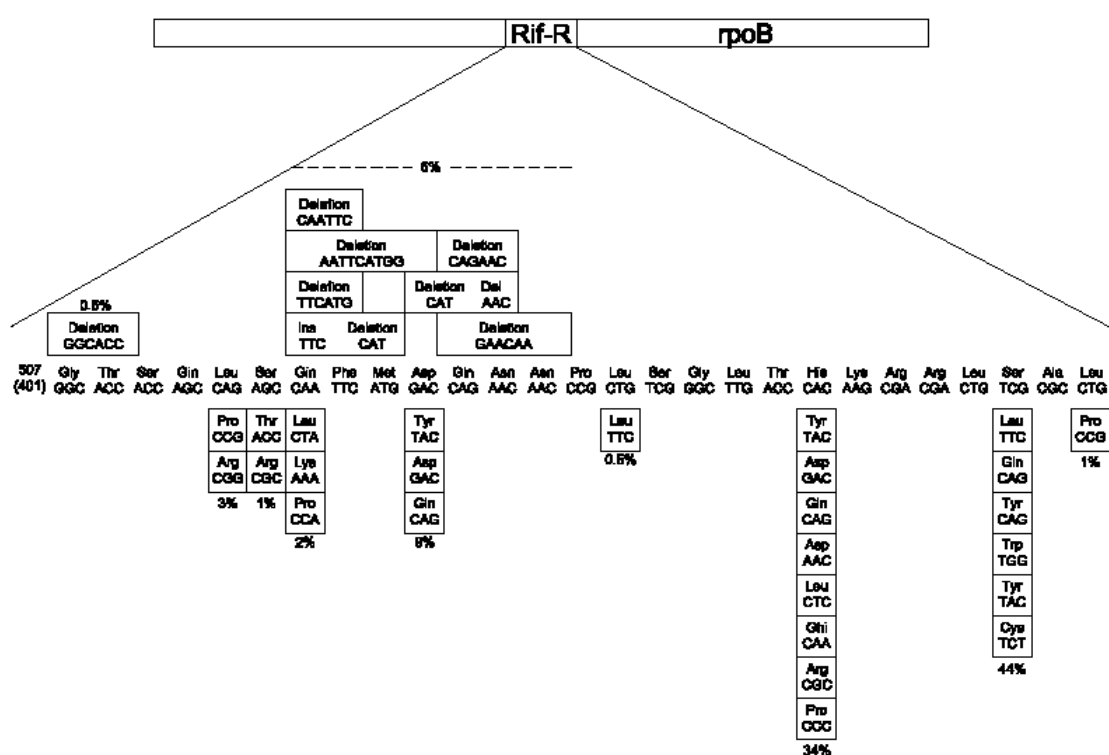


Figura 3. Esquema das mutações que ocorrem na região RRDR do gene *rpoB* no *M. tuberculosis* de acordo com COLE & TELENTI, (1995). Local onde são encontradas mais de 97% das mutações dos isolados RIF resistentes. A freqüência das mutações está expressa em porcentagem.

A resistência à RMP é observada com menor freqüência do que resistência à INH e SM (WHO, 2008), entretanto a resistência à RMP está, na maioria das vezes, associada a resistência à INH. Por esse motivo a RMP pode ser utilizada

como um possível marcador de TB-MDR (CAWS *et al.*, 2006; TORTOLI, *et al.*, 2007), já que seu mecanismo de ação é conhecido e a detecção da resistência, através de técnicas de biologia molecular, é menos complexa que a de outros fármacos. Estudos anteriores mostraram que mais de 95% das amostras resistentes à RMP estão associadas com mutações na região hipervariável do gene *rpoB* (TELENTI *et al.*, 1997; MANI *et al.*, 2001; CAVUSOGLU *et al.*, 2002; BROSSIER *et al.*, 2006). As mutações nos códons Ser531 e His526 são responsáveis por, aproximadamente, 75% das alterações que levam a resistência à RMP (VALIM *et al.*, 2000; MORCILLO *et al.*, 2002; YAM *et al.*, 2004; MIOTTO *et al.*, 2006; HÖFLING *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado por VALIM *et al.* (2000), foi analisada a região de 157pb no gene *rpoB* em 112 isolados de *M. tuberculosis*, r-resistentes à RMP, em diferentes estados do Brasil. Neste estudo, foram verificadas 22 mutações diferentes, envolvendo 7 códons mais freqüentes; 11 amostras exibiram mutações mais complexas, como alterações em duas bases no mesmo códon, deleções de códons e alterações em dois ou mais códons simultaneamente (tabela 4). Contudo nesta região estudada do gene *rpoB* não foram encontradas mutações silenciosas. As mutações mais freqüentes ocorreram nos códons 531, 526 e 516. Estudos realizados na Alemanha (HILLEMANN *et al.*, 2005) e Itália (MIOTTO *et al.*, 2006) também mostraram estes códons como sendo os mais freqüentemente mutados.

WEI-WEI *et al.* (2007) analisaram a região determinante de resistência (81pb) do gene *rpoB* em 121 amostras de *M. tuberculosis* isolados de pacientes de Beijing na China, onde 71 isolados foram caracterizados como resistentes à RMP. Dos isolados resistentes, 65 (91.5%) apresentavam mutação na região RRDR. As mutações mais freqüentes foram nos códons 531 (59.2%), 526 (12.6%) e 516 (2.8%). Outro estudo realizado na China Oriental (SHENG, *et al.*, 2008) analisou 54 amostras. A mutação mais freqüente encontrada foi na posição 526 (73,2%), seguido da posição 513 (10,7%) e 531 (3,5%). Na Turquia, CAVUSOGLU *et al.* (2006) analisou o gene *rpoB* em 41 amostras e observou uma freqüência de 56,1% das mutações no códon 531 e 17,1% no códon 526.

Tabela 4. Mutações encontradas no gene *rpoB* em isolados de *M. tuberculosis* do Brasil.

Posição dos códons	Seqüenciamento/mutações
511	CTG → CCG (Leu-Pro)
513	CAA → CCA (Gln-Pro)
516	GAC → GTC (Asp-Val), TAC (Asp-Tir)
522	TCG → TTG (Ser-Leu)
526	CAC → CTC (His-Leu), TAC (His-Tir), CGC (His-Arg), TGC (His-Cis), GAC (His-Asp), CTG (His-Leu)
531	TCG(Ser) → TTG(Leu), TGG(Trp)
533	CTG → CCT (Leu-Pro) e CGC (Leu-Arg)
531 e 514	TCG → TTG (Ser-Leu) e TTC → GTC (Fen-Val)
531 e 526	TCG → TTG (Ser-Leu) e CAC → TGC (His-Cis)
511 e 516	CTG → CGG (Leu-Arg) e GAC → GTC (Asp-Val)
511 e 515	CTG → CCG (Leu-Pro) e ATG → ATA (Met-Ile)
524, 525 e 526	TTG → TGG (Leu-Trp), ACC → CCC(Tre-Pro), CAC → CAG(His-Gln), e del AAG(Lis)
513 e del 514, 515 e 516	CAA → CAC(Gln-His), del TTC(Fen), ATG(Met), e GAC(Asp)
Del 515, 516, 517	del ATG(Met), GAC(Asp), CAG(Gln), e AAC(Asn)

(Adaptado de VALIM *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos nos estudos descritos acima mostram que as freqüências das mutações, conforme a região geográfica estudada e os dados obtidos, contribuem para o desenvolvimento de uma estratégia de diagnóstico para a resistência à RMP em *M. tuberculosis*.

2.4.3 Associação entre concentração mínima inibitória (CMI) e as mutações

Vários grupos vêm realizando estudos com isolados de *M. tuberculosis* obtidos de pacientes para compreender melhor a relação entre a CMI e as trocas estruturais na proteína RpoB. Alguns estudos buscaram associar os valores de CMI com o local e tipo de mutação.

A relação entre o grau de resistência à RMP e as mutações no gene *rpoB* foram analisadas por TANIGUCHI *et al* (1996) em 21 isolados de *M. tuberculosis* obtidos de pacientes no Japão. O teste de suscetibilidade à RMP foi realizado pelo método das proporções ou pelo método de microdiluição. Vinte linhagens apresentaram alterações de aminoácidos na RDRR e uma linhagem mostrou a

substituição 381V na região N-terminal da proteína RpoB. Isolados com mutações nos códons Gln513 (5%), His526 (33%) e Ser531 (43%) apresentaram alto nível de resistência (CMI \geq 50 μ g/ml). Em contraste, substituições de aminoácidos localizados na posição Phe514, Leu521 ou Leu533 resultaram em um baixo nível de resistência (CMI = 12,5 μ g/mL).

Em 1998, dois grupos de pesquisadores avaliaram os níveis de resistências conferidos pela CMI dos fármacos análogos da RMP (rifabutina, rifapentina e KRM-1648). Alterações nos códons Gln513 e Ser531 foram correlacionados com resistência para os três fármacos, ao contrário de alterações nos códon Met515, Leu521 e Leu533 que não influenciaram na susceptibilidade para RMP, rifabutina e KRM-1648. Linhagens com fenótipo resistente à RMP (CMI \geq 32 μ g/mL) foram resistentes à rifabutina e KRM-1648, mas com CMI menores (Yang *et al*, 1998). Alguns tipos de mutações foram relacionados com mutações cruzadas para RMP e seus análogos, enquanto que outros tipos de mutações foram relacionados com RMP e rifapentina, mas não com KRM-1648 (WILLIAMS *et al*, 1998).

SPINDOLA DE MIRANDA *et al* (2001) estudaram um total de 62 isolados do Brasil e da França através do seqüenciamento do DNA e da determinação da CMI pelo método das proporções em ágar Middlebrook 7H10, com concentrações de RMP entre 0,004 a 40 μ g/mL. Para os 14 isolados resistentes, do Rio de Janeiro, as mutações ocorreram nos códons Ser531 (39%), His526 (11%), Gln513 (5,5%) e dois isolados resistentes não apresentaram mutações. Para os 11 isolados resistentes de São Paulo, seis apresentaram mutações no códon Ser531. Foi encontrada uma nova dupla mutação em um isolado, onde os códons alterados foram Asp516Gly e Leu533Pro, com CMI \geq 40 μ g/mL. Analisando a distribuição dos tipos de mutações, observaram que o predomínio de mutações no códon Ser531 no Brasil, não ocorre nos isolados da França, onde apenas dois isolados apresentaram essa mutação.

SRIVASTAVA *et al* (2004) estudaram 55 isolados de cultura da Índia, através da técnica de hibridização comercialmente disponível, INNO-LiPA, identificaram as mutações no gene *rpoB* e a CMI desses isolados foram estabelecidas pelo método das proporções em meio LJ. Nos isolados fenotipicamente sensíveis não foi detectada nenhuma mutação. Em 60% dos

fenotipicamente resistentes (CMI \geq 64 $\mu\text{g/ml}$), foi possível verificar a mutação envolvida, pois houve hibridização nas sondas mutadas. Nos outros 26%, foi verificada a mutação pela falta de hibridização nas sondas selvagens. Os códons mutados mais freqüentes foram Ser531, His526 e Asp516.

HUITRIC *et al* (2006) estudaram 189 isolados resistentes da Suécia, através de seqüenciamento do DNA, para identificar as mutações no gene *rpoB*. As CMIs desses isolados foram estabelecidas pelo método das proporções em ágar Middlebrook 7H10 (0.0625 a 256 mg/L). As mutações de ponto mais freqüentes ocorreram nos códons His526, Ser531, e Ser522, e as freqüências foram 40%, 34% e 13% respectivamente. Estas amostras apresentaram valores de MIC \geq 32 mg/L.

2.5 Métodos para a detecção de resistência

2.5.1 Metodologias fenotípicas

São metodologias baseadas no crescimento de microorganismos na presença de uma concentração crítica de um fármaco anti-TB (HEIFTS, 2000).

Método das Proporções: foi padronizado por Canetti, Rist e Grosset em 1963 (teste padrão) e em 1969 (teste simplificado). A versão simplificada do teste, com apenas uma concentração da droga, é a mais utilizada. Consiste em um método manual para detectar a proporção de bacilos resistentes presentes em uma amostra de *M. tuberculosis* frente a uma concentração de fármaco, que é capaz de inibir o desenvolvimento dos bacilos sensíveis, mas não os resistentes, a concentração crítica (tabela 5). A cultura é feita em meio sólido LJ, a base de ovo, no qual as drogas são incorporadas antes da coagulação. No Brasil, esta é a metodologia recomendada pelo Ministério da Saúde para ser utilizada na rotina dos laboratórios de Bacteriologia da Tuberculose. Esta metodologia é sensível, de baixo custo, porém é laboriosa e fornece resultados somente depois de 60 dias, é considerada “padrão ouro” para a detecção de resistência em *M. tuberculosis* (CANETTI *et al.*, 1963; CANETTI 1965; CANETTI *et al.*, 1969; BRASIL, 2008)

O método das proporções também pode ser realizado em meio de cultura sólido a base de ágar (Middlebrook 7H10), recomendado pelo Center for Disease Control (CDC). Essa variante utiliza drogas em concentrações diferentes daquelas utilizada nos meios a base de ovos (KENT & KUBICA, 1985).

Tabela 5. Concentração crítica das drogas empregadas no teste de susceptibilidade de *M. tuberculosis* e proporção crítica de mutantes resistentes.

Fármaco	Concentração (µg/mL)	Proporções (%)
Isoniazida (INH)	0,2	1,0
Rifampicina (RMP)	40,0	1,0
Pirazinamida (PZA)	100,0	10,0
Estreptomicina (SM)	4,0	10,0
Etambutol (EMB)	2,0	1,0
Etionamida (ETH)	20,0	10,0

BACTEC-MGIT 960: disponibilizado no mercado pela empresa Becton & Dickinson Instruments System. É um método que utiliza um aparelho semi-automatizado e meio de cultura líquido a base de ágar (7H12A e 7H12B), feito com base fluorescente. Após 14 dias, o crescimento do microorganismo é visualizado através de fluorômetro. A metodologia é sensível, porém é onerosa e depende de um aparelho importado (PYFFER *et al.*, 1999; TORTOLI *et al.*, 2002).

MODS: *Microscopic Observation Broth Drug Susceptibility Assay* é uma metodologia realizada em meio líquido (7H9), em microplacas, que depois de 10 dias podem ser observadas no microscópio invertido com filtro para campo escuro para visualizar o fator corda formado pela micobactéria (CAVIEDES *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2002).

D29-Phage assay: metodologia manual realizada em meio líquido (7H9), baseia-se na capacidade do micobacteriófago D29 de infectar as células, quando a micobactéria é resistente aos fármacos. Quando o fago infecta a célula ele consegue lisar a parede celular detectando resistência. É uma metodologia trabalhosa que requer muita habilidade (MCNEMEY *et al.*, 1999)

Epsilon Test (E-Test): metodologia quantitativa de concentração mínima inibitória (CMI) das drogas. É uma metodologia manual, que utiliza meio sólido a base de ágar (7H11) e fitas impregnadas com um gradiente de concentração da

droga. Depois de um dia, a leitura é feita através da elipse formada no meio de cultura. Este método é fácil, porém as fitas são importadas o que torna o custo elevado (HAUSDORFER *et al.*, 1998).

MIC: (*Minimal Inhibitory Concentration*) Metodologia quantitativa da concentração inibitória mínima (MIC) da droga, é realizada em microplacas utilizando meio líquido a base de meio 7H9, onde a visualização do resultado se dá através da utilização de um corante que pode ser Alamar blue ou MTT. Esta metodologia é manual, trabalhosa e se torna o custo elevado, pois é necessário o uso de corantes importados (PALOMINO & PORTAELS, 1999; MSHANA 1998).

Todas as metodologias fenotípicas estão sendo utilizadas de alguma maneira no Brasil, algumas estão em fase de validação e outras, por sua vez, já podem ser utilizadas como rotina em laboratórios de bacteriologia da TB. Contudo, é importante lembrar que o método das proporções é o recomendado e que as demais metodologias podem ser realizadas paralelamente.

2.5.2 Metodologias genotípicas

Nos últimos anos, a genética, bem como a biologia molecular, têm sido ferramentas importantes para o estudo dos microorganismos, assim como o estudo da resistência aos fármacos. O estudo de mecanismos moleculares de resistência aos agentes antimicrobianos tem como resultado o desenvolvimento de alguns ensaios de genotipagem rápida para a detecção de resistência aos fármacos. Porém, deve-se ter claro que as bases genéticas da resistência ainda não estão esclarecidas na sua totalidade para todos os fármacos usados no tratamento da TB (ROSSETTI *et al.*, 2002).

Seqüenciamento: baseado em PCR, que é o método mais direto e confiável. Analisa todos os nucleotídeos de uma região escolhida específica do genoma. Permite estudar as mutações, detectando tanto as conhecidas como as ainda não conhecidas, através da análise e comparação de uma linhagem selvagem com uma resistente. Sendo possível identificar mutações na linhagem resistente que podem estar relacionadas com a resistência a determinado

fármaco. É uma metodologia muito sensível, eficaz e confiável, considerada padrão ouro quando se trata de diagnóstico molecular. Porém é muito onerosa, pois utiliza aparelhos de alto custo. (SOINI & MUSSER, 2001).

PCR-Heteroduplex : metodologia baseada na amplificação de uma região de DNA específica do genoma da micobactéria. Quando utilizado para a detecção de resistência à RMP amplifica-se uma região de 302 pb do gene *rpoB*. O produto amplificado de uma linhagem resistente é misturado com o volume igual do produto amplificado de uma linhagem sensível e esta mistura é aquecida a 95°C e congelada em seguida. O DNA híbrido dupla fita resultante é submetido à corrida eletroforética em gel de agarose e os resultados são visualizados por coloração com brometo de etídio. Produtos heteroduplex (anelamento de amplificações de produtos de linhagens sensíveis e resistentes) exibem mobilidades eletroforética diferentes quando comparados a um híbrido homoduplex. Esta metodologia oferece o resultado em 24 horas contudo o brometo de etídio é um reagente tóxico e teratogênico com dificuldade de ser desprezado no meio ambiente, o que dificulta o seu uso na rotina (WILLIAMS *et al*, 1994).

PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism): metodologia de análise da amplificação de uma região do DNA de interesse no genoma da micobactéria em um gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. Existe um padrão de banda, de uma linhagem selvagem, que é comparado com os vários padrões de bandas que aparecem nas linhagens resistentes. Por meio desta análise é possível identificar diferentes conformações de bandas (TELENTI *et. al.*, 1993a).

INNO-LiPA: teste comercializado pela empresa Innogenetics, Ghent, Bélgica. É baseado na amplificação por PCR de um segmento do gene *rpoB*. É uma metodologia colorimétrica baseada na hibridização reversa do produto amplificado do genoma da micobactéria com sondas específicas de uma região de 157pb do gene *rpoB*, previamente fixadas numa membrana de nitrocelulose. Este método não é tóxico, é sensível, fácil e rápido, fornecendo um resultado em 24 horas. Os resultados são visualizados através de sinais que aparecem na membrana depois de uma reação enzimática. Porém este teste tem um custo

extremamente elevado e não está disponível no Brasil (TORTOLI & MARCELLI, 2007).

GenoType MTBDRplus: teste comercializado pela empresa Hain Lifescience, Nehren, Alemanha. Também é uma metodologia colorimétrica baseada na hibridização reversa do produto amplificado do genoma da micobactéria com sondas específicas. Permite a identificação genética do complexo *M. tuberculosis* e da resistência à RMP e/ou INH a partir de amostras cultivadas ou diretamente de material pulmonar do paciente com microscopia positiva. A identificação da resistência à RMP é facultada pela detecção das mutações mais significativas do gene *rpoB*. Para testar o nível elevado de resistência à INH é examinado o gene *katG*, mais especificamente o códon 315. Recentemente, foi introduzido ao teste a região promotora do gene *inhA* para testar o nível baixo de resistência à INH. Este teste foi denominado GenoType MTBDRplus. Também possui um custo elevado e não está disponível no Brasil (SOMOSKOVI, *et al.*, 2006).

DNA-Microarray: metodologia baseada na análise de regiões mutadas através de um padrão estabelecido por hibridização com chip de oligonucleotídeos. O sistema é composto de uma matriz com várias sondas de DNA fixadas que, posteriormente, serão hibridizadas e os resultados registrados e interpretados usando-se programas de computador. O método é rápido e eficiente porém requer pessoal treinado e tem custo elevado (KIVI *et al.*, 2002; SHIMIZU *et al.*, 2008).

Reverse-Line Blot Hybridization Assa (RIFO assay) e PLH-Rifoligotyping (PLH): essas metodologias são semelhantes ao INNO-LiPA e também detectam a resistência da micobactéria à RMP. Ambas utilizam sondas e hibridização reversa. A diferença entre essas metodologias e o teste INNO-LiPA é o tipo de membrana e a visualização dos resultados. Nestes testes, os resultados são visualizados num filme de raio-X. Estas são metodologias rápidas e fáceis e fornecem resultado em 24 horas, porém os reagentes são caros e tóxicos e exigem um ambiente para revelação do filme (KREMER *et al.*, 1997; MORCILO *et al.*, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento e padronização de uma metodologia molecular utilizando hibridização reversa capaz de identificar mutações na região RRDR do gene *rpoB*, que estão relacionadas com a resistência à RMP em isolados de *M. tuberculosis*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Padronizar a técnica de PCR duplex para o gene *rpoB* juntamente com o elemento de inserção IS6110;
- ✓ Desenvolver um protocolo de hibridização com um sistema de detecção colorimétrico;
- ✓ Padronizar o método desenvolvido com DNAs provenientes de cultura de *M. tuberculosis*;
- ✓ Comparar os resultados obtidos com o seqüenciamento da região RRDR do gene *rpoB* e com o teste de suscetibilidade ao antimicrobiano rifampicina;
- ✓ Comparar alguns resultados obtidos do teste padronizado com o método comercial GenoType MTBDR;
- ✓ Avaliar a sensibilidade e a especificidade da técnica desenvolvida;
- ✓ Avaliar a técnica padronizada para o uso diretamente em amostra clínica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

O estudo foi composto por uma amostragem de conveniência, não mascarada, pertencente ao banco de amostras já existente no Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul (LACEN-RS), da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (FEPPS/RS). Este estudo consiste no desenvolvimento de um teste molecular para detecção direta de resistência à RMP em *M. tuberculosis*.

4.2 Local de desenvolvimento do estudo

O trabalho foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CDCT da FEPPS/RS; em Porto Alegre.

4.3 Amostras

Os 156 isolados de *M. tuberculosis* foram provenientes do banco amostral do LACEN-RS; 25 isolados clínicos coletados entre novembro 2006 e setembro de 2007, neste mesmo Laboratório, e seis isolados clínicos coletados em janeiro de 2008 no Laboratório de Microbiologia e Virologia – Centro Regionale di Riferimento per i Micobatteri, Ospedaliera di Careggi, Florença, Itália. A linhagem padrão H37Rv foi utilizada como controle.

4.4 Critérios de inclusão

Foram incluídos isolados que possuíam identificação bioquímica compatível para *M. tuberculosis* e com resultado de teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) pelo método das proporções (Canetti *et al.*, 1963).

As amostras clínicas incluídas no estudo foram todas aquelas sem manipulação prévia até a chegada ao setor de bacteriologia, com posterior identificação compatível para *M. tuberculosis* e resultado de TSA.

4.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo todos os isolados de *M. tuberculosis* sem a identificação pelas provas bioquímicas e sem o resultado de TSA.

As amostras clínicas excluídas do estudo foram todas que sofreram algum tipo de manipulação antes de chegar ao setor de bacteriologia, sem identificação bioquímica compatível para *M. tuberculosis* e resultado de TSA.

4.6 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS/RS (protocolo nº 03/2006).

4.7 Isolamento e cultura de *M. tuberculosis*

A cultura primária de *M. tuberculosis* foi realizada a partir de amostras de pacientes provenientes do laboratório incluído no estudo. O material foi descontaminado com NaOH 4% e semeado em meio Löwestein-Jensen (LJ-Difco), sendo cultivado à 37°C durante 4 a 6 semanas. Todos os isolados foram submetidos ao teste de provas bioquímicas para identificação do complexo *M. tuberculosis*, tendo como resultados: niacina positiva, nitrato positivo e catalase 68°C negativa (KUBICA, 1973; Ministério da Saúde – Brasil, 1994).

4.8 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA)

Após o cultivo primário, os isolados foram submetidos ao TSA pelo método das proporções padronizado por Canetti (1963), para determinação da resistência. No TSA, foram utilizados os seguintes fármacos: rifampicina (40µg/mL), isoniazida (0,2µg/mL), estreptomicina (4µg/mL), etambutol (2µg/mL), pirazinamida (100µg/mL) e etionamida (20µg/mL). Foram utilizadas as proporções críticas da população bacteriana no qual os indicadores de resistência são: em isoniazida (INH) 1%, rifampicina (RMP) 1%, estreptomicina (SM) 10%, etambutol (EMB) 1%, etionamida (ETH) 10% e pirazinamida (PZA) 10%.

4.9 Extração de DNA de *M. tuberculosis* de cultura

Os isolados foram submetidos à extração do DNA conforme técnica descrita por VAN SOOLINGEN *et al.* (1994). Neste processo, a massa bacteriana (uma alçada) foi transferida para um tubo de microcentrífuga com 400 µL de TE 1X e em seguida colocado em banho-maria a 80°C por 20 min. A lise bacteriana foi realizada através da adição de 50 µL de lisozima a 10 mg/mL e agitação (agitador automático) e incubação durante a noite a 37°C. Depois da incubação, foi adicionado 75 µL da solução SDS 10 %/Proteinase K e a mistura foi incubada em banho-maria a 65°C por 10 min; foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 100 µL de CTAB/NaCl₂ (solução pré-aquecida a 65°C). A mistura foi agitada novamente e incubada em banho-maria a 65°C por 10 min. Foi adicionada 750 µL da solução de clorofórmio/álcool isoamílico seguido de homogeneização e centrifugação por 5 min a 12.000 rpm. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol. A mistura foi incubada a -20°C por 30 min e após a incubação houve uma nova centrifugação de 15 min a 12.000 rpm, o sobrenadante foi removido, seguido da adição de 1 mL de etanol 70% gelado. Realizou-se, novamente, uma centrifugação de 5 min a 12.000 rpm, o etanol foi removido, e o resíduo de DNA colocado para secar por 30 min à temperatura ambiente. Depois do resíduo já seco, foram adicionados 30 µL de TE 1X. O DNA extraído ficou a 4°C por, pelo menos, dois dias para ressuspensão completa do resíduo e foi estocado a -20°C. O produto da extração foi checado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador U.V..

4.10 Extração de DNA de *M. tuberculosis* de amostra clínica

O DNA de *M. tuberculosis* das amostras clínicas foi extraído conforme técnica adaptada de BOOM *et al.* (1990). As amostras respiratórias foram tratadas previamente com o método N-acetyl-L-cysteine-NaOH (KENT & KUBICA, 1985). Após, foram centrifugadas por 10 min e retirado o sobrenadante. Neste, foi adicionado 100 µL de tampão de lise (Gu.HCl 8,0 M, Tris HCl 0,08 M, EDTA 0,040 M, Triton X-100 2%). Os sobrenadantes foram homogeneizados em vórtex e

colocados a 100°C por 10 min. Após, foram centrifugadas por 1 min. Novamente, foram retirados os sobrenadantes, e estes colocados em tubos previamente preparados com 2,5 µL de resina (SiO₂). O sobrenadante foi retirado e descartado. O pellet foi lavado com 200 µL de Solução de Lavagem (Gu.HCl 8,0M, Tris HCl 0,080M) por duas vezes. Após, foi adicionado 200 µL de Etanol 70°, centrifugados por 1 min e retirado o sobrenadante. Os tubos foram fechados e colocados a 56°C por 10 min. Posteriormente, foram abertos os tubos e mantidos à temperatura ambiente por 5 min. Foram adicionados 33 µL de TE 1X em cada tubo, homogeneizados em vórtex e colocados por 10 min a 56°C. Após, foram centrifugados por 1 min e retirados os sobrenadantes (30 µL). Estes foram transferidos para tubos novos de 0,5 mL, previamente identificados com o número da amostra e data.

4.11 Padronização da PCR-duplex

4.11.1. Oligonucleotídeos utilizados para reação da PCR (*primers*)

Os *primers* Rif1 (5'-GGTCGCCGCGATCAAGGAGT-3') e Rif2 (5'-BIO-TGCACGTCGCGGACCTCCA-3'), sendo o *primer* Rif2 biotilado, foram baseados na região do gene *rpoB* envolvida na resistência à rifampicina (número de acesso no Genbank U12205). Estes amplificam uma seqüência de, aproximadamente, 157 pares de base (pb) que codificam do aminoácido 511 ao 531. Os oligonucleotídeos foram construídos tendo como referência à seqüência de DNA descrita por TELENTI *et al.* (1993).

Parte da seqüência de inserção IS6110, usada como marcador para o complexo *M. tuberculosis*, foi amplificada usando os *primers* IS1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3') e IS2 (5'-BIO-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3'), como descrito por HERMANS *et al.* (1990), que amplificam uma seqüência de 245 bp. O *primer* IS2 foi biotilado.

4.11.2 Reação de PCR

A PCR duplex foi padronizada em um volume final de 50 µL contendo 200 µM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCL (pH 8), 50 mM KCL, 2 mM MgCL₂, 10 pmoles de cada *primer* (Rif1/Rif2, IS1/IS2), 2.5 U de Taq DNA polimerase (Cebiot, UFRGS, Brasil).

Para amplificação de material extraído de cultura foi utilizado 50 ng de DNA e para a amplificação das amostras clínicas 10 µL do material processado.

Para garantir a qualidade foram utilizados dois controles de reação de PCR: o controle positivo (DNA de *M. tuberculosis* H37Rv, 100 ng) e o controle negativo (água).

4.11.3. Condições da reação da PCR

Para amplificação de DNA extraído de cultura a reação de PCR foi realizada em termociclador automático (MiniCycler™, M.J. Research Inc) utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 65°C por 1 min e extensão de 72°C por 1,5 min, totalizando 30 ciclos. Após a conclusão dos 30 ciclos, realizou-se uma nova extensão a 72°C por 4 min. Na amplificação do DNA das amostras clínicas foram utilizadas as mesmas condições descritas acima, porém foram realizados 40 ciclos.

4.11.4 Detecção do produto amplificado

Os produtos da amplificação da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, preparado com TEB 1X, corado com brometo de etídio e visualizados em um transluminador de U.V.. A voltagem de corrida variou de 50V a 100V.

O marcador de peso molecular utilizado para comprovação do tamanho do fragmento durante as corridas eletroforéticas foi de 100 pb (Gibco BRL).

4.11.5 Especificidade analítica dos oligonucleotídeos

A especificidade dos *primers* foi testada através da amplificação do DNA de outros microorganismos causadores de doenças infecciosas. São eles: *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Haemophilus influenzae* e *Escherichia coli*, obtidos na seção de microbiologia do LACEN.

4.12 Seqüenciamento

O gene *rpoB* foi amplificado utilizando os primers Rif1 e Rif2. As amplificações foram realizadas no termociclador Mini-Cycler–Hot Bonnet PTC–150 (MJ Research) como segue: 94°C por 2 min, 65°C por 1 min, e 72°C por 2 min por 30 ciclos. Os produtos de PCR foram purificados com o método de polietilenoglicol (PEG) (<http://pubmlst.org/neisseria/mlst-info/nmeningitidis/pcr.shtml>) e seqüenciados utilizando Big Dye® Kit Terminator Cycle Sequencing com AmpliTaq DNA polimerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no seqüenciador ABI Prism 3100 DNA (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. As seqüências foram analisadas utilizando o programa PREGAP e GAP4 do pacote STADEN 10.0. As seqüências de nucleotídeos com valores de phred > 20 foram consideradas para análise.

4.13 Detecção de Resistência à RMP pelo Teste Colorimétrico de Hibridização Reversa (TCHR-TB)

Um total de 10 oligonucleotídeos para *screening* dos genótipos selvagem e mutado mais freqüentes do gene *rpoB* foram desenhados usando o programa Primer Express v2.0 (Applied Biosystems). Também foi desenhado um oligonucleotídeo específico para o complexo *M. tuberculosis* (MTC) complementar a seqüência interna do elemento de inserção *IS6110*. Todos os oligonucleotídeos (Invitrogen) foram desenhados com grupamento 5' amino terminal. As seqüências dos oligonucleotídeos estão listadas na tabela 6.

Tabela 6. Características dos oligonucleotídeos do TCHR-TB

oligo	Seqüência de Nucleotídeos (5' -- 3')	pb	T _m (°C)	GC%	Tipo	Posição (codon)	pmol/10 μ L
Rif1	CAGCCAGCTGAGCCAATTCAT	21	61.2	52.4	Selvagem	511	0.19
Rif2	TTCATGGACCAGAACCAACCC	20	56.9	50	Selvagem	516	50
Rif3	CGCTGTCGGGGTTGACC	17	59.6	70,6	Selvagem	522	100
Rif4	TTGACCCACAAGCGCCGACT	20	64.8	60	Selvagem	526	50
Rif5	CTGTGGGCGCTGGGGC	16	63.6	81.2	Selvagem	531	50
Rif2m	CCAATTCATGATCAGAA	21	57.0	42.9	Mutante	516	50
Rif4ma	GTTGACCTACAAGCGCCG	18	56.5	55.6	Mutante	526	50
Rif4mb	GGTTGACCGACAGCGCC	18	61.2	66.7	Mutante	526	100
Rif5ma	CTGTTGGCGCTGGGGC	16	60.9	75	Mutante	531	50
Rif5mb	CGACTGTGGGCGCTGG	16	59.5	75	Mutante	531	100
IS	T ₉ GCCCGTCCCGCCGATCTC	18	67.0	77,8	Selvagem	----	11.6

Códons marcados: posição do códon onde ocorre mais freqüentemente as mutações.

4.13.1. Preparação da membrana (Biodyne C) e fixação dos oligonucleotídeos

A membrana de nylon (Biodyne C, Pall Corporation) foi incubada em 10 mL de uma solução gelada de 16%(w/v) de EDAC (1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, Acros Organics) por 15 min à temperatura ambiente e lavada em água destilada por 2 min. As sondas foram diluídas em NaHCO₃ 0,5 M, pH 8,4 para as concentrações determinadas (tabela 6) e aplicadas em 11 círculos que foram desenhados previamente na membrana. Dez microlitros de cada um dos oligonucleotídeos, contendo a amina na extremidade 5', foram ligados aos grupamentos carboxil da membrana ativada através de uma ligação covalente. Dentro de outro círculo, foi adicionado 10 μ L de conjugado estreptavidina fosfatase alcalina (Invitrogen) a 0,01 μ g/ μ L, usado como controle do conjugado (cc). A membrana foi tratada com uma solução fresca de NaOH 0.1 M por 10 min à temperatura ambiente e lavadas em água destilada durante 2 min a temperatura ambiente. A membrana foi lavada em 2X SSC / 0.1% SDS por 10 min a 50°C e em 20 mM EDTA pH8 por 15 min à temperatura ambiente. As membranas foram estocadas em tubos de 2 mL a 4°C até serem utilizadas.

4.13.2. Hibridização reversa e detecção colorimétrica:

Vinte microlitros de produto da PCR, foram adicionados a 150 μ L de 2X SSC / 0,1% SDS, desnaturados por 10 min a 100°C e transferidos imediatamente

para um banho de gelo. As membranas foram lavadas por 5 min a 50°C em 2X SSC / 0.1% SDS e, então, bloqueadas com a incubação em 2X SSC com 3% de soro de albumina bovina (BSA, INLAB) a 50°C por 15 min. Os produtos de PCR foram adicionados aos tubos contendo as membrana e mais 1 mL de solução de hibridização (2X SSC / 0.1% SDS), que foi incubado a 62°C por 45 min. Após a hibridização, as membranas foram lavadas uma vez com 2X SSC / 0,5% SDS e outra com 0,2X SSC / 0.5% SDS por 10 min a 57°C. Para o segundo bloqueio as membranas foram tratadas com tampão TSB (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) contendo 6% BSA por 30 min a 50°C. Após foram lavadas com TSB por 5 min à temperatura ambiente. As membranas foram incubadas em uma solução de 0,33 µg/mL de conjugado streptavidina fosfatase alcalina em tampão TSB por 15 min à temperatura ambiente. O conjugado que não ligou na biotina do *primer* foi removido após uma lavagem com tampão TSB por 10 min e outra com tampão TSA por 10 min à temperatura ambiente.

O sinal de hibridização foi visualizado pela adição de 40 µg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (BCIP, Sigma) e 82,5µg/mL de nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) em tampão TSA durante 10 min à temperatura ambiente. O resultado foi a formação de precipitado de cor púrpura quando havia uma correspondência perfeita entre o oligonucleotídeo e o produto de PCR biotilado. A reação colorimétrica foi interrompida com água destilada. As membranas foram secas à temperatura ambiente e os resultados anotados. O mesmo procedimento foi realizado para os controles negativo e positivo da PCR.

4.14 Análise estatística

O teste de *Kappa* foi utilizado para avaliar o grau de concordância entre o TCHR-TB e o seqüenciamento e entre o TCHR-TB e o TSA para DNA cultura. Para as amostras clínicas com baciloscopia positiva foi avaliado o grau de concordância entre o TCHR-TB e o TSA. A sensibilidade, especificidade da técnica de PCR foram calculados para predizer a ocorrência de resistência. As análises foram realizadas no programa estatístico SPSS versão 12.0. Os resultados foram considerados significativos se o $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA)

Os isolados de *M. tuberculosis* foram submetidos ao TSA para RMP. Entre os 156 isolados, 52 eram resistentes (tabela 7). Entre as 33 amostras clínicas, 13 obtiveram crescimento na cultura e três destas eram resistentes (tabela 11).

5.2 Padronização das condições da PCR-duplex

Para a padronização da reação de PCR-duplex foram utilizados 50 ng de DNA extraído de cultura de *M. tuberculosis* (H37Rv) e os *primers* RIF1, RIF2, IS1 e IS2. A amplificação dos produtos foi visualizada em gel de agarose 1,5% e corada com brometo de etídio. Foi possível observar dois fragmentos, um de 157 pb e outro de 245 pb, correspondendo ao gene *rpoB* e a seqüência de inserção *IS6110* respectivamente (figura 4).

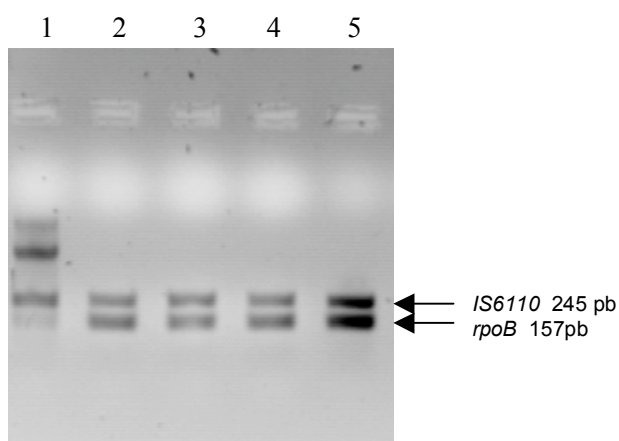


Figura 4. Visualização dos produtos da PCR-duplex em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Canaleta 1 – marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2 a 4 - diferentes amplificações de isolados de *M. tuberculosis*; canaletas 5 – linhagem padrão H37Rv

5.3 Seqüenciamento do fragmento amplificado

Foi realizado o seqüenciamento do fragmento amplificado pelos *primers* RIF1 e RIF2 dos 156 isolados de cultura usados na padronização do TCHR-TB. Os resultados estão apresentados na tabela 7.

5.4 Especificidade analítica dos *primers*

A especificidade analítica dos *primers* foi testada através da amplificação de DNA de outros microorganismos causadores de doenças infecciosas. Em nenhum isolado das bactérias *N. meningitidis*, *P. pneumoniae*, *S. enterica*, *H.s influenzae* e *E. coli*, houve amplificação dos fragmentos testados.

5.5 Sensibilidade do método

O limite de detecção da PCR-duplex foi de 10 pg em gel agarose (figura 5). O experimento foi repetido com resultados similares. Análise dos produtos de PCR obtidos com dois pares de *primers* RIF1/RIF2 e IS1/IS2 com diluição seriada de DNA *M. tuberculosis* H37Rv.

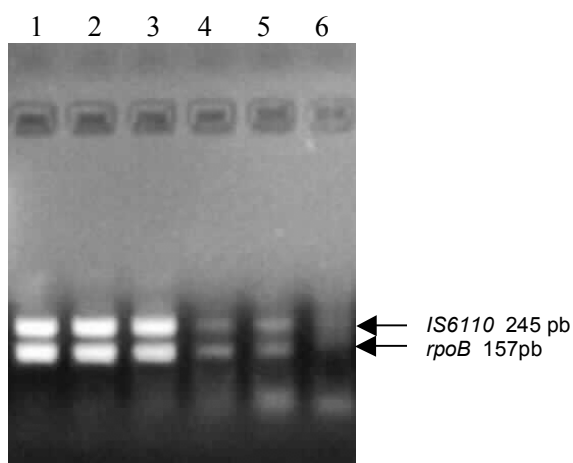


Figura 5. Sensibilidade analítica da PCR-duplex. Eletroforese em gel de agarose (1,5%). Canaleta 1: 100 ng de DNA; canaleta 2: 10 ng; canaleta 3: 1 ng; canaleta 4: 100 pg; canaleta 5: 10 pg; canaleta 6: 1 pg.

Os mesmos produtos de PCR utilizados para visualização em gel foram utilizados para verificar a sensibilidade analítica do TCHR-TB padronizado. A sensibilidade encontrada para o teste foi de 1 pg.

Tabela 7. Correlação entre TCHR-TB, seqüenciamento e teste de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de cultura.

TCHR-TB		Resultados TCHR (localização da mutação no <i>rpoB</i>)	Seqüenciamento		No. de amostras	TSA (canetti) à RIF	
Positivo para oligos selvagens	Positivo para oligos mutados		codon(s) afetados no <i>rpoB</i>	Nucleotídeos/trocas de amino ácido		R	S
1, 2, 3, 4	Mut S531L	S531L	531	TCG→TTG/Ser→Leu	18	17	1
1, 2, 3, 5	Mut H526Y	H526Y	526	CAC→TAC/His→Tyr	3	3	-
1, 2, 3, 5		525-529	526	CAC→CGC/His→Arg	3	3	-
1, 2, 3, 5	Mut H526D	H526D	526	CAC→GAC/His→Asp	2	2	-
1, 2, 3, 5		525-529	526	CAC→CTC/His→Leu	1	1	-
1, 2, 3, 5		525-529	526	CAC→TGC/His→Cys	2	1	1
1, 2, 4, 5		519-525	522	TCG→TTG/Ser→Leu	1	1	-
1, 3, 4, 5	Mut D516V	D516V	516	GAC→GTC/Asp→Val	6	6	-
1, 3, 4, 5		514-520	516	GAC→TAC/Asp→Tyr	1	1	-
1, 2*, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	516	GAC→TAC/Asp→Tyr	1	1	-
1*, 2, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	513	CAA→CCA/Gln→Pro	1	1	-
2, 3, 4, 5		509-514	511	CTG→CCG/Leu→Pro	1	1	-
1, 3, 5		514-520	516	GAC→GGC/Asp→Gly	1	1	-
		525-529	526	CAC→AAC/His→Asn			
2, 3, 4		509-514	514	TTC→GTC/Phe→Val	1	1	-
	Mut S531L	S531L	531	TCG→TTG/Ser→Leu			
3, 4, 5		509-514	511	CTG→CCG/Leu→Pro	1	1	-
		514-520	515	ATG→ATA/Met→Ile			
1, 2, 5		519-525	524	TTG→TGG/Leu→Pro	1	1	-
		525-529	525	ACC→CCC/Thr→Pro			
			526	CAC→CAG/His→Gln			
			527	Del AAG/Lis			
3, 4, 5		509-514	513	CAA→CAC/Gln→His	1	1	-
		514-520	514	Del TTC/Fen			
			515	Del ATG/Met			
			516	Del GAC/Asp			
1, 4, 5		514-520	516	GAC→GAG/Asp→Glu	1	1	-
		519-525	522	TCG→TTG/Ser→Leu			
1, 3, 4, 5	Mut D516V	D516V	516	GAC→GTC/Asp→Val	1	1	-
			522	TCG→TTG/Ser→Leu			
1, 2*, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	511	CTG→CGC/Leu→Arg	1	1	-
			516	GAC→TAC/Asp→Tyr			
3, 4, 5		509-514	514	TTC→TTT/Fen→Fen	1	1	-
		514-520	516	GAC→GTC/Asp→Val			
1, 3, 4, 5		514-520	516	GAC→TAC/Asp→Tyr	1	1	-
			518	AAC→CAC/ Asn→ His			
1, 3, 4, 5		525-529	526	CAC→CGC/His→Arg	1	1	-
			529	CGA→CAA/ Arg →Gln			
1, 3, 4, 5		514-520	516	GAC→GGC/Asp→Gly	1	1	-
			529	CGA→CAA/ Arg→Gln			
1, 3, 4, 5		514-520	517	Del CAG/ Gln	1	1	-
			518	Del AAC/ Asn			
1, 2, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	Sem mutação	Sem mutação	103	1	102

* Sinal de hibridização fraca

5.6 Análise da região RRDR do gene *rpoB* pelo TCHR-TB

Cinco sondas selvagens Rif1, Rif2, Rif3, Rif4 e Rif5 foram desenvolvidas para detectar variações na região RRDR de 81 pb do gene *rpoB*, o que inclui a sequência do códon 509 ao 534 (figura 6).

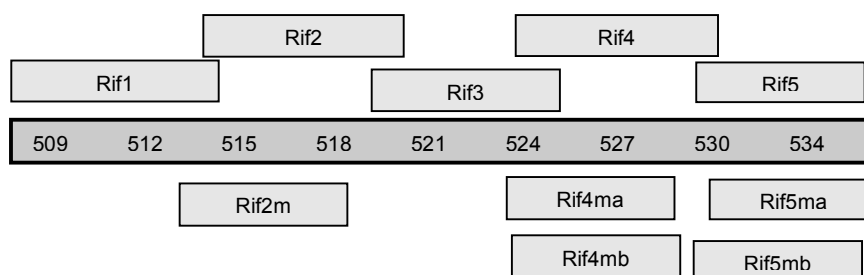


Figura 6. Localização dos oligonucleotídeos dentro da região RRDR de 81-pb do gene *rpoB*.

Isolados com genótipo selvagem para esta região foram interpretados como sensíveis à RMP, e aqueles com genótipo mutante foram considerados resistentes à RMP. A presença de mutações foi demonstrada tanto pela hibridização com a sonda mutada correspondente Rif5ma (Ser531Leu), Rif5mb (Ser531Trp), Rif4ma (His526Tyr), Rif4mb (His526Asp), Rif2m (Asp516Val) como também pela falta de hibridização da respectiva sonda selvagem (tabela 6 e figura 7)

Os resultados dos padrões de hibridização mais comuns estão apresentados na figura 7.

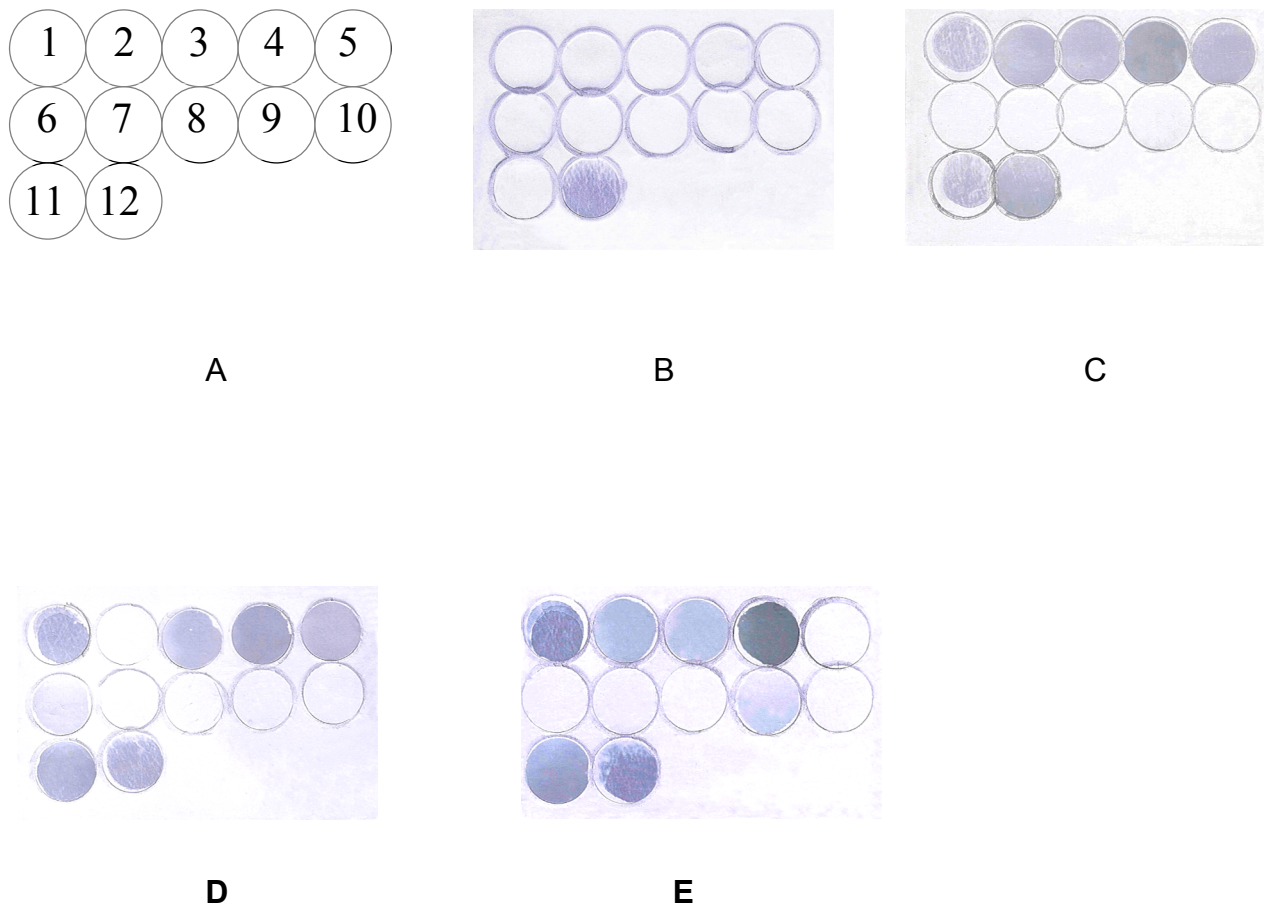


Figura 7. Desenho da membrana e resultados mais comuns de padrões de hibridização com o TCHR-TB. A: posição dos oligonucleotídeos na membrana, 1 = Rif1, 2 = Rif2, 3 = Rif3, 4 = Rif4, 5 = Rif5, 6 = Rif2m, 7 = Rif4ma, 8 = Rif4mb, 9 = Rif5ma, 10 = Rif5mb, 11 = IS, 12 = controle do conjugado; B: Padrão de hibridização do controle negativo; C: Padrão de hibridização dos produtos de PCR das amostras sem mutação na região RRDR do gene *rpoB*; D: Padrão de hibridização produtos de PCR das amostras com mutação no códon Asp516Val; E: Padrão de hibridização produtos de PCR das amostras com mutação no códon Ser531Leu.

5.6.1 Comparação do TCHR-TB com método das proporções

Dos 52 isolados considerados resistentes pelo método das proporções, 48 (92,3%) apresentaram mutações na região hipervariável do gene *rpoB*, detectadas pelo teste TCHR-TB (tabela 8). Um isolado foi considerado selvagem pelo TCHR-

TB. Nas outras três amostras, a hibridização foi fraca em alguma sonda selvagem em relação as demais, dificultando, assim, o diagnóstico mais preciso da resistência.

Cento e dois (98,1%) dos 104 isolados suscetíveis à RIF hibridizaram apenas com as sondas selvagens. Um isolado mostrou um padrão de hibridização referente à presença da mutação Ser531Leu, e outro referente à presença da mutação na região da sonda Rif4 (códon 525-529). A sensibilidade e a especificidade do TCHR-TB foram 92,3% e 98,1%, respectivamente, quando comparado com o método das proporções. O valor de *kappa* foi 0,927 ($p < 0,001$).

Tabela 8. Correlação entre TCHR-TB e teste de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de cultura

TCHR-TB		Resultados TCHR (localização da mutação no <i>rpoB</i>)	No. de amostras	TSA (canetti) à RIF	
Positivo para oligos selvagens	Positivo para oligos mutados			R	S
1, 2, 3, 4	Mut S531L	S531L	18	17	1
1, 2, 3, 5	Mut H526Y	H526Y	3	3	-
1, 2, 3, 5		525-529	3	3	-
1, 2, 3, 5	Mut H526D	H526D	2	2	-
1, 2, 3, 5		525-529	1	1	-
1, 2, 3, 5		525-529	2	1	1
1, 2, 4, 5		519-525	1	1	-
1, 3, 4, 5	Mut D516V	D516V	6	6	-
1, 3, 4, 5		514-520	1	1	-
1, 2*, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	1	1	-
1*, 2, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	1	1	-
2, 3, 4, 5		509-514	1	1	-
1, 3, 5		514-520	1	1	-
2, 3, 4		525-529			
	Mut S531L	509-514	1	1	-
		S531L			
3, 4, 5		509-514	1	1	-
		514-520			
1, 2, 5		519-525	1	1	-
		525-529			
3, 4, 5		509-514	1	1	-
		514-520			
1, 4, 5		514-520	1	1	-
		519-525			
1, 3, 4, 5	Mut D516V	D516V	1	1	-
1, 2*, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	1	1	-
3, 4, 5		509-514	1	1	-
		514-520			
1, 3, 4, 5		514-520	1	1	-
1, 3, 4, 5		525-529	1	1	-
1, 3, 4, 5		514-520	1	1	-
1, 3, 4, 5		514-520	1	1	-
1, 2, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	103	1	102

5.6.2 Comparação do TCHR-TB com seqüenciamento

Dos 53 isolados que possuem mutações na região RRDR do gene *rpoB*, de acordo com os resultados do seqüenciamento, 48 (90,6%) foram corretamente detectadas pelo teste RLBH (tabela 9). Cinco isolados discordaram do seqüenciamento. O primeiro isolado possuía uma mutação na posição 513 (CAA→CCA) e hibridizou com todas as cinco sondas selvagens, porém o sinal de hibridização foi fraco no local da sonda Rif1(códons 509-514). O segundo isolado possuía a mutação no códon 516 (GAC→TAC) e, da mesma forma, hibridizou com todas as cinco sondas selvagens, com sinal de hibridização fraco no local da sonda Rif2 (códons 514-520). O terceiro isolado possuía duas mutações pontuais no códon 511 (CTG→CGC) e 516 (GAC→GTC) e também hibridizou com todas as cinco sondas selvagens, com sinal de hibridização fraco no local da sonda Rif1 e Rif2 respectivamente. O quarto isolado, também possuía duas mutações de ponto, 516 (GAC→GGC) e 529 (CGA→CAA). A mutação no códon 516 foi corretamente detectada pela falta de hibridização com a sonda Rif2. No entanto, a mutação no códon 529 não foi corretamente detectada, pois havia sinal de hibridização no local da sonda Rif4 (códons 525-529). No quinto isolado com duas mutações pontuais nos códons 516 (GAC→GTC) e 522 (TCG→TTG), o teste TCHR-TB detectou corretamente a mutação no códon 516 pela falta de hibridização no local da sonda Rif2. Entretanto, havia sinal de hibridização no local da sonda Rif3 (códons 519-525), não tendo sido detectada a mutação no códon 522. Todos os 103 isolados sem mutação na região RRDR do gene *rpoB* hibridizaram corretamente com todas as sondas selvagens. Os locais que possuíam as sondas mutadas apareceram sem sinal de hibridização, enquanto o local com a sonda IS e do controle do conjugado foram visualizados com precipitado de cor púrpura (figura 7). O controle negativo da PCR apenas ligou no local do controle do conjugado (figura 7). A sensibilidade e especificidade do TCHR-TB foram 90,6% e 100%, respectivamente, quando comparado com o seqüenciamento. O valor de *kappa* foi 0,956 ($p < 0,001$).

Tabela 9. Correlação entre TCHR-TB e sequenciamento dos isolados de cultura

TCHR-TB		Resultados TCHR (localização da mutação no <i>rpoB</i>)	Sequenciamento		No. de amostras
Positivo para oligos selvagens	Positivo para oligos mutados		codon(s) afetados no <i>rpoB</i>	Nucleotídeos/trocas de amino ácido	
1, 2, 3, 4	Mut S531L	S531L	531	TCG→TTG/Ser→Leu	18
1, 2, 3, 5	Mut H526Y	H526Y	526	CAC→TAC/His→Tyr	3
1, 2, 3, 5		525-529	526	CAC→CGC/His→Arg	3
1, 2, 3, 5	Mut H526D	H526D	526	CAC→GAC/His→Asp	2
1, 2, 3, 5		525-529	526	CAC→CTC/His→Leu	1
1, 2, 3, 5		525-529	526	CAC→TGC/His→Cys	2
1, 2, 4, 5		519-525	522	TCG→TTG/Ser→Leu	1
1, 3, 4, 5	Mut D516V	D516V	516	GAC→GTC/Asp→Val	6
1, 3, 4, 5		514-520	516	GAC→TAC/Asp→Tyr	1
1, 2*, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	516	GAC→TAC/Asp→Tyr	1
1*, 2, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	513	CAA→CCA/Gln→Pro	1
2, 3, 4, 5		509-514	511	CTG→CCG/Leu→Pro	1
1, 3, 5		514-520	516	GAC→GGC/Asp→Gly	1
		525-529	526	CAC→AAC/His→Asn	
2, 3, 4	Mut S531L	509-514	514	TTC→GTC/Phe→Val	1
		S531L	531	TCG→TTG/Ser→Leu	
3, 4, 5		509-514	511	CTG→CCG/Leu→Pro	1
		514-520	515	ATG→ATA/Met→Ile	
1, 2, 5		519-525	524	TTG→TGG/Leu→Pro	1
			525	ACC→CCC/Thr→Pro	
		525-529	526	CAC→CAG/His→Gln	
			527	Del AAG/Lis	
3, 4, 5		509-514	513	CAA→CAC/Gln→His	1
		514-520	514	Del TTC/Fen	
			515	Del ATG/Met	
			516	Del GAC/Asp	
1, 4, 5		514-520	516	GAC→GAG/Asp→Glu	1
		519-525	522	TCG→TTG/Ser→Leu	
1, 3, 4, 5	Mut D516V	D516V	516	GAC→GTC/Asp→Val	1
			522	TCG→TTG/Ser→Leu	
1, 2*, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	511	CTG→CCG/Leu→Arg	1
			516	GAC→TAC/Asp→Tyr	
3, 4, 5		509-514	514	TTC→TTT/Fen→Fen	1
		514-520	516	GAC→GTC/Asp→Val	
1, 3, 4, 5		514-520	516	GAC→TAC/Asp→Tr	1
			518	AAC→CAC/Asn→His	
1, 3, 4, 5		525-529	526	CAC→CGC/His→Arg	1
			529	CGA→CAA/Arg→Gln	
1, 3, 4, 5		514-520	516	GAC→GGC/Asp→Gly	1
			529	CGA→CAA/Arg→Gln	
1, 3, 4, 5		514-520	517	Del CAG/Gln	1
			518	Del AAC/Asn	
1, 2, 3, 4, 5		<i>rpoB</i> selvagem	Sem mutação	Sem mutação	103

5.6.3 Comparação do TCHR-TB com o teste GenoType MTBDR

Os resultados do TCHR-TB de 15 DNAs de cultura foram comparados com os resultados do GenoType MTBDR e foi encontrada uma concordância de 100% e o valor de kappa foi 1,0 ($p < 0,001$). Quando estes resultados foram comparados com o sequenciamento, 14 amostras concordaram. Porém, uma amostra, que possuía mutações nos códons 516 e 529, não concordou, pois a mutação no

códon 529 não foi detectada corretamente em nenhum dos dois ensaios (Tabela 8).

Tabela 10. Correlação entre TCHR-TB, teste GenoType MTBDR e Seqüenciamento

Amostras n=15	Seqüenciamento	GenoType (localização da mutação no <i>rpoB</i>)	TCHR (localização da mutação no <i>rpoB</i>)
2	S531L (TCG-TTG)	S531L	S531L
1	H526Y (CAC-TAC)	H526Y	H526Y
1	S522L (TCG-TTG)	518 - 525	519-525
1	H526R (CAC-CGC) R529Q (CGA-CAA)	526 - 529	525-529
1	516 (GAC-TAC) 518 (AAA-CAC)	510 - 517 513 - 519	514-520
1	516 (GAC-GGC) 529 (CGA-CAA)	510 - 517 513 - 519 526 - 529*	514-520
1	E514K (GAA-AAA) D516V (GAC-GTC)	510 - 517 513 - 519	509-514 514-520
7	Sem mutação	Hibridizou nos selvagens	Hibridizou nos selvagens

* Sinal de hibridização fraco.

5.6.4 Comparação do TCHR-TB com TSA em amostras clínicas

Os resultados das análises de DNA extraído diretamente de amostras clínicas por TCHR-TB foram comparados com TSA (Tabela 11). Verificou-se que houve concordância nos resultados de todas as amostras, sendo o valor de *kappa* 1,0 ($p < 0,001$).

Todos isolados com baciloscopia positiva apresentaram corretamente hibridização na sonda do IS (marcador para o complexo *M. tuberculosis*) e no controle do conjugado. Nas dez amostras sensíveis à RIF houve hibridização nas cinco sondas selvagens. Uma amostra resistente à RIF apresentou hibridização nas sondas selvagens, menos na Rif5 (códon 530-534), e mostrou hibridização na sonda Rif5ma referente a mutação Ser531Leu. As outras duas amostras resistentes à RIF também apresentaram hibridização nas sondas selvagens, menos na Rif5, no entanto, não hibridizaram em nenhuma sonda com mutação. Nos isolados com baciloscopia negativa houve hibridização apenas no controle do conjugado.

Tabela 11. Correlação entre TCHR-TB e TSA das amostras clínicas

Amostras clínicas (n=33)	baciloscopia	Cultura	TSA	TCHR-TB Padrão de Hibridização
18	Neg	Neg	nr	Sem hibridização
2	Neg	1 col	nr	Sem hibridização
10	++	+++	RMP(S)	Rif1, Rif2, Rif3, Rif4, Rif5
1	+++	+++	RMP(R)	Rif1, Rif2, Rif3, Rif4 e Rif5ma
2	++	+++	RMP(R)	Rif1, Rif2, Rif3, Rif4

Legenda: RMP(S) = *M. tuberculosis* sensível a rifampicina, RMP(R) = *M. tuberculosis* resistente a rifampicina, neg = negativo, col = colônia, nr = não realizado, (+) = 10 to 99 bacilos por 100 campos, (++) = 1 to 10 bacilos por campo em 50 campos, (+++) = Mais de 10 bacilos por campo em 20 campos (<http://wwwn.cdc.gov/dls/ila/documents/lstc2.pdf>).

6 DISCUSSÃO

Uma pessoa com tuberculose ativa poderá infectar uma média de 10 a 15 outras pessoas por ano (DYE *et al.* 2005). A importância de detectar a resistência aos antimicrobianos em isolados de *M. tuberculosis* é justamente possibilitar o início do tratamento mais adequado e eficaz precocemente, evitando que o paciente dissemine a linhagem resistente na população. Além disso, poder contribuir para a redução do custo total do tratamento (JIAO *et al.*, 2007).

O teste de sensibilidade é recomendado para pacientes com baciloscopia positiva que não se torna negativa após dois meses de tratamento, para pacientes com baciloscopia negativa que volta a ser positiva durante o tratamento para TB e para aqueles tratados previamente para TB, isto é, nos casos de recidivas. Também são candidatos ao teste os pacientes co-infectados com HIV e TB e pacientes com TB que mantiveram contato com pacientes com suspeita de TB resistente ou TB resistente confirmada (ROSSETTI *et al.*, 2002). Porém, a cultura e o TSA não são realizados rotineiramente no país, o que dificulta a identificação do perfil da resistência inicial ou primária para casos suspeitos, como os pacientes contatos ou HIV positivos (VIEIRA *et al.*, 2007).

Através de técnicas de biologia molecular, tem sido possível avançar na determinação da resistência aos fármacos utilizados no tratamento da TB. Com o intuito de auxiliar no diagnóstico da TB resistente, este estudo, teve como objetivo desenvolver uma metodologia molecular para identificação das principais mutações já descritas envolvidas na resistência à RMP. Sendo a resistência à RMP, na maioria das vezes, associada a resistência à INH, a detecção da resistência à RMP pode ser utilizada como um marcador de TB-MDR (CAWS *et al.*, 2006; TORTOLI, *et al.*, 2007) e, além disso, mais de 95% das amostras resistentes à RMP estão associadas com mutações na região RRDR de 81 pb do gene *rpoB* (TELENTI *et al.*, 1997; MANI *et al.*, 2001; CAVUSOGLU *et al.*, 2002 *et al.*, BROSSIER *et al.*, 2006), o que facilita o desenvolvimento do teste.

Alguns estudos indicam que isolados que possuem mutações nos códons 526 e 531 mostraram altos níveis de resistência à RMP e resistência cruzada entre rifabutina e RMP. Um estudo verificou que as mutações nos códons His526, Ser531 e Ser522 estão relacionadas com alta resistência à RMP, apresentando valores de CMI ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ (HUITRIC *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou que as

mutações nos códons Ser531, His526 e Asp516 apresentaram CMI ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ (SRIVASTAVA *et al.*, 2004). Os códons Gln513 e Ser522 também mostraram valores altos de CMI, porém com menor frequência (SPINDOLA DE MIRANDA *et al.*, 2001). No estudo realizado por WILLIAMS *et al.* (1998), verificou-se que as mutações nos códons Met515, Leu521 e Leu533 não influenciaram na suscetibilidade à RMP, rifabutina e KRM-1648. Porém em outro estudo, as mutações nos códons Leu533 e Leu521 resultaram em um baixo nível de resistência (CMI = 12,5 $\mu\text{g/mL}$), assim como a mutação no códon Phe514 (TANIGUCHI *et al.*, 1996). Isto sugere que a detecção da mutação na região RRDR do gene *rpoB* pode não ser apenas uma estratégia para a detecção de resistência, mas também uma ferramenta para a detecção do nível de resistência, visto que os códons mais prevalentes também são os códons que apresentam maior nível de resistência (WILLIAMS *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 1998; CASUVOGLU *et al.*, 2006).

O ensaio desenvolvido mostrou alta sensibilidade analítica, detectando uma pequena quantidade de DNA (1 pg) da linhagem padrão H37Rv. Os produtos de PCR de *N. meningitidis*, *P. pneumoniae*, *S. enterica*, *H. influenzae* e *E. coli* não hibridizaram com nenhuma sonda, apenas o controle do conjugado mostrou a formação do precipitado de cor púrpura. Em outro estudo os mesmos resultados de especificidade foram encontrados (SEKIGUCHI *et al.*, 2007).

O uso do TCHR-TB permitiu detectar rapidamente (um dia) as mutações mais frequentes presentes dentro da região hipervariável de 81 pb do gene *rpoB* e identificar os isolados clínicos pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. Para as mutações menos frequentes, o teste indicou a presença de alteração genética. Todas as 156 amostras foram corretamente identificadas pelo TCHR-TB como sendo pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*.

O ensaio, quando comparado com o TSA (Método das Proporções), identificou corretamente 48 (92,3%) das 52 amostras resistentes à RMP. Um dos isolados que era resistente pelo TSA foi considerado selvagem pelo TCHR-TB, no seqüenciamento esta amostra também apresentou a seqüência selvagem na região em estudo do gene *rpoB*. Isto demonstra que o método pode possuir limitações em situações que as mutações se encontram fora da região de detecção ou quando a resistência é causada por outros mecanismos, como bombas de efluxo e/ou mudança de permeabilidade da membrana celular

(BARTFAI *et al.*, 2001; HEEP *et al.*, 2001; WATTERSON *et al.*, 1998; CAWS *et al.*, 2006). Dos outros três isolados, que não foram corretamente identificados, cada um mostrou hibridização fraca em uma das sondas Rif1, Rif2 e Rif2, respectivamente, (tabela 7) em relação as demais, indicando a provável a presença de população mista (MÄKINEN *et al.*, 2006).

Dos 104 isolados suscetíveis à RMP pelo TSA, 102 (98,1%) foram corretamente identificados como suscetíveis pelo TCHR-TB, pois estes hibridizaram com as sondas selvagens. Os dois isolados que não foram corretamente identificados, um apresentou a mutação Ser531Leu, que geralmente produz altos níveis de resistência, e outro uma mutação na região da sonda Rif4 (códon 525-529). Esta discordância entre o TSA e o TCHR-TB provavelmente ocorreu devido a pequena quantidade de bacilos mutantes, a qual não foi suficiente para ser detectada pelo teste fenotípico.

Em outro estudo, no qual também foi desenvolvido um teste semelhante para detecção de resistência à RMP, utilizando hibridização reversa, resultados semelhantes foram encontrados. Neste estudo foram utilizadas cinco sondas com a seqüência selvagem e seis com as mutações mais freqüentes. Os resultados foram comparados com TSA e 90 das 97 amostras foram corretamente identificadas como resistentes, obtendo, assim, uma sensibilidade de 92,8% (MORCILLO *et al.*, 2002).

Quando comparado com seqüenciamento, considerado “padrão ouro” para testes genotípicos, o TCHR-TB identificou corretamente 48 (90,6%) das 53 amostras que possuíam mutações na região em estudo. Levando em consideração somente as mutações mais freqüentes (códon 531 e 526), o TCHR-TB detectou corretamente 100% das mutações.

Das cinco amostras que o teste não identificou corretamente, um dos isolados, que possuía a mutação 529 (CGA→CAA), mostrou um sinal de hibridização fraco no local da sonda Rif4 (códon 525-529). Isto não foi totalmente inesperado, pois o códon 529 está localizado na região 3' final da sonda. Entretanto, esta mutação provavelmente não é clinicamente relevante, pois foi detectada em uma amostra que possuía outra mutação mais freqüente 516 (GAC→GGC). Outro isolado, que possuía a mutação 513 (CAA→CCA), mostrou sinal de hibridização fraco no local da sonda Rif1 (códon 509-514), provavelmente devido ao alto conteúdo GC da sonda na porção final oposta a

este códon. As outras três amostras discordantes mostraram um padrão de hibridização incorreto, provavelmente devido à presença de uma mistura de linhagens de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes.

A população bacteriana muitas vezes possui bacilos suscetíveis e resistentes, é possível que tanto o genótipo selvagem quanto o mutado estivessem presentes nos produtos da PCR, os quais podem ter comprometido a análise baseada no DNA. Entretanto, o resultado do seqüenciamento destes isolados não indicou a presença de população mista. Porém, em um outro estudo, que compara dois ensaios comerciais de hibridização reversa com o seqüenciamento, foi observado que resultados discrepantes podem indicar que os ensaios em membrana são melhores que o seqüenciamento para indicar população mista (MÄKINEN *et al.*, 2006). Este mesmo estudo comparou o teste comercial Genotype MTBDR com seqüenciamento e verificou uma concordância de 92,3% para a resistência à RIF. Porém, neste trabalho, o teste comercial não detectou corretamente a mutação Ser531Leu em duas amostras e a mutação Hys526Asp em outra, mesmo possuindo sondas específicas para detectar estas mutações (MÄKINEN *et al.*, 2006).

Comparando o TCHR-TB com o teste comercial Genotype MTBDR, os resultados das 15 amostras testadas foram 100% concordantes. Das 15 amostras, 14 (93,3%) obtiveram o mesmo resultado do seqüenciamento. Os dois ensaios apresentaram dificuldades em detectar a mutação 529 (CGA→CAA), pois este códon se apresenta na extremidade da sonda Rif4 no TCHR-TB, dificultando sua detecção, como anteriormente mencionado. Como esta mutação não é muito freqüente, uma sonda específica para sua detecção não foi desenhada. A dificuldade do teste TCHR-TB em detectar a mutação, provavelmente foi a mesma para o teste comercial Genotype MTBDR pois neste, o códon 529 também se encontra na extremidade da sonda.

Alguns estudos compararam o teste comercial Genotype MTBDR com seqüenciamento e verificaram uma sensibilidade de 99% (102 de 103 amostras) 92,3% (48 de 53), 95,1% (39 de 41) e 91,5% (130 de 142) (HILLEMANN *et al.*, 2005; CAVUSOGLU *et al.*, 2006; MIOTTO *et al.*, 2006; MÄKINEN *et al.*, 2006). Nestes trabalhos a maioria das amostras apresentavam as mutações mais freqüentes na população, mutações as quais o nosso teste identificou corretamente.

O método desenvolvido neste trabalho também teve capacidade de detectar a resistência à RMP em DNA extraído diretamente de amostras clínicas. Os resultados do TCHR-TB para as 33 amostras foram comparados com o TSA e mostraram 100% de concordância. Entretanto, em duas amostras as mutações foram identificadas apenas pela falta de sinal de hibridização na sonda selvagem correspondente. As amostras clínicas analisadas apresentavam resultado de baciloscopia positiva, não tendo sido avaliada a eficácia do TCHR-TB em amostras paucibacilares. A maioria dos testes comerciais, como o GenoType MTBDR, recomendam somente a análise de amostras com baciloscopia positiva (http://www.hain-lifescience.com/pdf/304xx_pbl.pdf). Um estudo mostrou que o GenoType MTBDR detectou corretamente, diretamente de amostras clínicas respiratórias, 95% das 38 amostras baciloscopia positiva (BANG *et al.*, 2006). Outro estudo, em que o GenoType foi testado em 42 amostras clínicas respiratórias com baciloscopia positiva, foi encontrado 100% de concordância com TSA (RAMASWAMY & MUSSER, 1998). Outro estudo testou 48 amostras clínicas resistentes à RIF e baciloscopia positiva, sendo 42 amostras respiratórias e 6 não-respiratórias. Todas as amostras possuíam a mutação 531 (TCG→TTG) e em 100% destas a mutação foi corretamente detectada pelo GenoType MTBDR. Neste mesmo estudo foram avaliadas 33 amostra clínicas resistentes à RIF e com baciloscopia negativa, sendo que o GenoType MTBDR conseguiu detectar corretamente 5 de 19 (26%) das amostras respiratórias e 9 de 14 (64%), das não respiratórias (VIJDEA, *et al.*, 2008). Verificando assim uma diminuição na sensibilidade. ZHANG *et al.* (2007) desenvolveram um teste semelhante a esse para detecção de resistência à RMP, no qual foram utilizadas cinco sondas com a seqüência selvagem e cinco com as mutações mais freqüentes, em que foram testados DNAs extraídos diretamente de amostras clínicas. Neste estudo, o teste detectou corretamente 46 (88,5%) de 52 amostras quando comparado com o TSA . Destas amostras, 53,85% possuíam a mutação 531 (TCG→TTG). Porém neste trabalho não haviam informações sobre baciloscopia das amostras utilizadas.

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram uma alta taxa de concordância entre o teste padronizado, o método das proporções e o seqüenciamento. Verificou-se bons resultados tanto para DNA extraído de cultura como para DNA extraído diretamente de amostras clínicas (escarro). O método desenvolvido apresentou boa sensibilidade, 90,0% comparado com o

seqüenciamento e 92,3% comparado com o TSA, e ótima especificidade, 100% comparado com o seqüenciamento e 98,0% comparado com o TSA.

Além disso, é um teste rápido, que pode ser realizados em 48 horas, incluindo a extração de DNA das amostras, a PCR e a hibridização reversa. Estas metodologias baseadas em hibridização reversa diminuem o tempo de diagnóstico de 60 para 32 dias ao prescindir do TSA, que demora 30 dias em média. Quando o teste é realizado diretamente de amostras clínicas o diagnóstico da resistência pode ser liberado em dois dias, podendo auxiliar muito no diagnóstico da resistência de *M. tuberculosis*, não apenas otimizando o tratamento mas sendo especialmente importante na prevenção da transmissão da TB-MDR.

7. CONCLUSÃO

O método desenvolvido (TCHR-TB) pode ser aplicado com sucesso quando se faz necessário um teste rápido e sensível para um correto manejo dos pacientes. No entanto, as metodologias genotípicas apesar de sofisticadas não podem ser utilizadas de modo isolado no diagnóstico laboratorial de rotina, pois um resultado genotípico sensível pode não excluir a possibilidade de resistência fora da região avaliada. Dessa forma, é necessário realizar métodos fenotípicos em conjunto (MIOTTO *et al.*, 2006; HILLEMANN *et al.*, 2007). Contudo, a biologia molecular possibilitará maior rapidez para iniciar o tratamento anti-TB, principalmente quando a linhagem for considerada resistente, diminuindo a morbi/mortalidade e também evitando a disseminação de linhagens resistentes no meio ambiente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANAZ, A.; LIENANA, E.; GOMEZ-MAMPASO, E.; GALAN, J. C.; COUSIN, D.; ORTEGA, A., BLANQUEZ, J.; BLAQUERO, F.; MATEOS, A.; SUAREZ, G., and DOMINGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol*, 3:1263-73, 1999.

ATS. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. The official statement of the American Thoracic Society and the Centers of Disease Control and Prevention (CDC) and the Council of the Infectious Disease Society of America. *Am J Respir Crit Care Med*, 161:1376-1395, 2000.

BARDAROV JR, S.; DOU, H.; EISENACH, K.; BANAIIEE, N.; YA, S.; CHAN, J.; JACOBS JR, W.R., and RISKKA, P.F. Detection and drug-susceptibility testing of *M. tuberculosis* from sputum samples using luciferase reporter phage: comparison with the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system. *Diag Microbiol Infect Dis*, 45:53-61, 2003.

BARROSO E. C.; MOTA R. M. S.; MORAIS M. F. M.; CAMPELO C. L.; BARROSO J. B.; RODRIGUES J. L. N.; Fatores associados aos tratamentos inadequados em grupo de portadores de tuberculose multirresistente. *J Pneumol*. 29(6):350-7, 2003.

BARTFAI, Z.; SOMOSKOVI, A.; KODMON, C.; SZABO, N.; PUSKAS, E.; KOSZTOLANYI, L.; FARAGO, E.; MESTER, J.; PARSONS, L.M.; & SALFINGER, M. Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. *J. Clin. Microbiol*. 39:3736–3739, 2001.

BATES, J. H. Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis. *Clin. Chest. Med.*, 1:167-174, 1980.

BEN-DOV I. & MASON GR. Drug-resistant tuberculosis in Southern California Hospital: trends from 1969 to 1984. *Am Rev Respir Dis*;135: 1307-10, 1987.

BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; UM, K.S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; DE LISE, G., and JACOBS JR, W.R. *inhA*, a

gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 263:227-230, 1994.

BLANCHARD, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 215-239, 1996.

BLOWER S. M.; CHOU T. Modeling the emergence of the 'hot zones': tuberculosis and the amplification dynamics of drug resistance. *Nat Med*. Oct;10(10):1111-6, 2004

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008

BRENNAN, P. J.; & NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, 64:29-63, 1995.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 28,495-503, 1990.

BRAGA, J. U.; BARRETO, A. M. W.; HIJJAR, M. A. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995 – 1997, IERDTB. Parte III: principais resultados. *Bol Pneumol Sanit*, 11(1):76-81, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Controle da Tuberculose. Uma aposta de integração ensino-serviço/CNCT/NUTES. 3 ed. rev. Rio de Janeiro, p. 29-30, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Pneumologia Sanitária. Manual de normas para o controle da tuberculose. 4ª Edição. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde/FUNASA. Guia de Vigilância Epidemiológica. 1ª Edição. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª Edição. Rio de Janeiro, FUNASA/CRPHF/SNPT, 2002b.

CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J.; HAUDUROY, P.; LANGEROVA, M.; MAHLER, H.; MEISSNER, G.; MITCHISON, D.; & SULA, L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull. World Health Org.* 29:565–578, 1963.

CANETTI, G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, 92(5):687-703, 1965.

CANETTI, G.; FOX, W.; KHOMENKO, A.; MAHLER, H.T.; MENON, N.K.; MITCHISON, D.A.; RIST, N.; AND SMELEV, N. A. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull. World Health Org.* 41:21–43, 1969

CASUVOGLU, C.; TURHAN, A.; AKINCI, P.; AND SOYLER, I. Evaluation of the Genotype MTBDR Assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 44:2338–2342, 2006.

CAVIEDES, L.; LEE, T.S.; GILMAN, R.H.; SCHEEN, P.; SPELLMAN, E.; LEE, E.H.; BERG, D.E.; MONTENEGRO-JAMES, S.M., and The Tuberculosis Working Group in Peru. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. *J Clin Microbiol*, 38(3):1203-1208, 2000.

CAWS, M.; DUY P. M.; THO, D. Q.; LAN, N. T.; HOA, D. V. FARRAR J. Mutations prevalent among rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a hospital in Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 44(7):2333-7, 2006.

GOOZÉ, L. & DALEY, C. L. Tuberculosis and HIV. HIV InSite Knowledge Base Chapter. Disponível em: <http://hivinsite.ucsf.edu>, 2003

CHOPRA, I. & BRENNAN, P. Molecular action of antimycobacterial agents. *Tuberc Lung Dis*, 78:89-98, 1998.

COLE, S.T. & TELENTI, A., Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. Respir. J.* 8:701-713, 1995.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHUCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HOMSBY, T.; JEGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY,

L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; & BARREL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393: 537-544, 1998.

COLL, P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 21(6): 299-308, 2003.

COLSTON M. J. & COX R. A. Mycobacterial growth and dormancy. In: *Mycobacteria: molecular biology and virulence*. 1ª ed. London: Blackwell Science p.198-219, 1999.

CUNHA F. A. & FROTA C. C. Bases moleculares da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* as drogas usadas no tratamento da tuberculose – revisão *Rev. Bras. Análises clínicas*, vol. 37(3): 157-161, 2005

DALCOLMO, M. P.; FORTES, A.; MELO, F. F.; MOTTA, R.; NETTO, J. I.; CARDOSO, N.; ANDRADE, M.; BARRETO, A. W.; & GERHARDT, G. Estudo da efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil. *J. Pneumol*. 25:70-77, 1999.

DALLA COSTA, E. R. Caracterização das mutações envolvidas na resistência à isoniazida em isolados de *Mycobacterium tuberculosis* do Brasil, Argentina e Peru. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

DROBNIOWSKI F.; RÜSCH-GERDES S.; HOFFNER S. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (EUCAST document E.DEF 8.1)--report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Review. *Clin Microbiol Infect*. Dec;13(12):1144-56, 2007

DYE C.; ESPINAL M. A.; WATT C. J.; MBIAGA C.; WILLIAMS B. G. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis*. 15:1197-1202, 2002.

DYE, C.; WATT, C. J.; BLEED, D. M.; MEHRAN HOSSEINI, S.; RAVIGLIONE, M. C. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing

tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA*; 293: 2767-75, 2005.

ESPINAL, M. A.; LASERSON, K.; CAMACHO, M.; FUSCHENG, 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*, 5(10):887-893, 2001.

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

FORTES, A.; & DALCOMO, M. P. Tuberculose Multirresistente. *Pulmão*. v. 6, n. 2, p. 68-80, 1997.

FUCHS, F. D. & WANNACHER, L. Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1992.

GALÉ, E. F.; CUNDLIFE, E.; REYNOLDS, P. E.; RICHMOND, M. H.; WARING, M. J. The Molecular Basis of Antibiotic Action. New York: John Wiley & Sons, 1981.

GANDHI, N. R.; MOLL, A. & STUR, A. W. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet*, 368: 1575-80, 2006.

GILLESPIE, S. H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(2):267-274, 2002.

GILMAN, A. G. & GOODMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 8ª edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1990.

GOODFELLOW, M. & MAGGE, J.G. Taxonomy of mycobacteria. In Gangadharam P. R. J., Jenkins, P.A. (ed). *Mycobacteria – Basic Aspects*. Chapman & Hall. New York, 1998.

HAUSDORFER, J.; SOMPEK, E.; ALLERBERGER, F.; DIERICH, M. P.; & RÜSCH-GERDES, S. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2(9):751-755, 1998.

HERMANS, P. W.; SCHUITEMA, A. R.; SOOLINGEN, D. V.; VERSTYNNEN, C. P.; BIK, E. M.; KOLK, A. H. & VAN EMBDEN, J. D. Specific detection of

Mycobacterium tuberculosis complex strain by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28:1204-1213, 1990.

HEEP, M.; BRANDSTÄTTER, B.; RIEGER, U.; LEHN, N.; RICHTER, E.,; RUSCH-GERDES, S.; & NIEMANN, S. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 39:107–110, 2001.

HEIFETS, L.; LINDER, T.; SANCHEZ, T.; SPEMCER, D., & BRENNAN, J. Two liquid medium systems, Mycobacterium Growth Indicator Tube and MB Redox Tube, for *Mycobacterium tuberculosis* isolation from sputum specimens. *J Clin Microbiol*, 38(3):1227-1230, 2000.

HILLEMANN, D.; WEIZENEGGER, M.; KUBICA T.; RICHTER, E. & NIEMANN, S. Use of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Complex isolates. *J Clin Microbiol*, 43: 3699-703, 2005.

HILLEMANN, D., RÜSCH-GERDES, S., AND RICHTER, E., Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 45: 2635–2640, 2007.

HÖFLING, C. C.; PAVAN, E. M.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; FERRAZOLI, L.; AILY, D. C. G.; DE ALBUQUERQUE, D. M.; RAMOS, M. C. Prevalence of *katG* Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil, *Int. J Tuberc Lung Dis* 9(1):87–93, 2005.

HORSBURGH C. R. JR. The global problem of multidrug-resistant tuberculosis: the genie is out of the bottle. *JAMA*; 283:2575-6, 2000.

HUIDRIC, E.; WERNGREN, J.; JURE'EN, P.; & HOFFNER, S. Resistance Levels and *rpoB* Gene Mutations among In Vitro-Selected Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2860–2862, 2006.

HWANG, H. Y.; CHANG, C. Y.; CHANG, L. L.; CHANG, S. F.; CHANG, Y. H., & CHEN, Y.J. Characterization of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *J Med Microbiol*, 52:239-245, 2003.

INDERLIED, C. B. Antimycobacterial susceptibility testing: present practices and future trends. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13(11):980-993, 1994.

ISEMAN, M. D. Evolution of drug-resistant tuberculosis: a tale of two species. *91:2428-2429*, 1994.

IUATLD (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease). Management of Tuberculosis. A Guide for Low Income Countries. Paris, France. 5th Edition, 2000.

JIAO, W. W.; MOKROUSOV, I.; SUN, G. Z.; LI, M.; LIU, J. W.; NARVSKAYA, O. & SHEN, A. D. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China. *Chinese Medical Journal (Engl)*, 120: 814-9, 2007.

JIN, D. J. & GROSS, A. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol*, 202:45-58, 1988.

KENT, P. T. & KUBICA, G. P. Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory. Atlanta, GA: Centers for Diseases Control, 1985.

KIVI, M. L.; XUEMIN, S.; RAYCHAUDHURI, R.; ALTMAN, B. & SMALL, P. M. Determining the genomic locations of repetitive DNA sequence with a whole-genome microarray IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 40(6):2192-2198, 2002.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D. & VAM ZETTEN, M. PCR + Reverse Line Blot Hybridization (PHL) to detect rifampin resistance. Laboratory Manual. National Institute of Public Health and Environment. Bilthoven, 1997.

KUBICA, G. Differential Identification of Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*, 107: 9-20, 1973.

LAL, R. & LAL, S. Recent trends in Rifamycin research. *BioEssays*, 16:211-216, 1994.

MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E. & DOLIN, R. Mandell, Douglas and Bennett (Ed.). *Principles and Practices of Infectious Diseases*. 4^a Edition. New York, EUA, 1995.

MANI, C.; SELVAKUMAR, N.; NARAYANAN, S. & NARAYANAN, P. R. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. *J Clin Microbiol*, 39(8):2987-2990, 2001.

MAKINEN, J.; MARTTILA, H. J.; MARJAMAKI, M.; VILJANEN, M. K. & SOINI, H. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for

detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 44, 350-352, 2006.

MCNERNEY R.; WILSON S. M.; SIDHU A. M.; HARLEY V. S.; AL SUWAIDI Z.; NYE P. M.; PARISH T. & STOKER N. G. Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as a tool for the detection of viable *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. *Res Microbiol*, 149(7):487-95, 1998.

MDLULI, K.; SALYDEN, R. A., ZHU, Y., RAMASWAMY, S.; PAN, X.; MEAD, D.; CRANE, D.D.; MUSSER, J.M., & BARRY III, C.E. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl ACP synthetase by isoniazid. *Science*, 280(3):1607-1610, 1998.

METCHOCK, B. G.; NOLTE, F. S. & WALLACE Jr, R. J. Mycobacterium. In: Murray, P. R. (ed). Manual of clinical microbiology. 7th Edition. ASM, 1999.

MIGLIORI, G. B.; LANGE, C.; CENTIS, R.; SOTGIU, G.; MÜTTERLEIN, R.; HOFFMANN, H.; KLIIMAN, K.; DE IACO, G.; LAURIA, F. N.; RICHARDSON, M. D.; SPANEVELLO, A. & CIRILLO, D. M.; TBNET STUDY GROUP Resistance to second-line injectables and treatment outcomes in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis cases. *Eur Respir J*, Jun;31(6):1155-9, 2008.

MIOTTO, P.; PIANA, F.; PENATI, V.; CANDUCCI, F.; MIGLIORI, G. B.; & CIRILLO, D. M. Use of Genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. *J Clin Microbiol*, 44:2485–2491, 2006.

MITCHISON, D. A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle*, 66:219-226, 1985.

MOKROUSOV, I.; SUN, G.; LI, M.; LIU, J.; NARVSKAYA, O. & SHEN, A. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China JIAO W. *Chin Med J*, 120(9):814-819, 2007.

MORCILLO, N.; ZUMARRAGA, M.; ALITO, A.; DOLMANN, A.; SCHOULS, L. & CATALDI, A. A low cost, home-made, reverse-line blot hybridisation assay for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 6:959-965, 2002.

MSHANA, R. N.; TADESSE, G.; ABATE, G., & MIÖRNER, H. Use of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide for rapid detection of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 36(5):1214-1219, 1998.

OKAMOTO, S.; TAMARU, A.; NAKAJIMA, C.; NISHIMURA, K.; TANAKA, Y.; TOKUYAMA S.; SUZUKI, Y. & OCHI, K. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol*, 63(4):1096-106, 2007.

PABLOS-MENDÉZ, A.; RAVIGLIONE, M.C.; LAZLO, A.; BINKIN, N.; RIEDER, H. L.; BUSTREO, F.; CHN, D. L.; VAN WEENZENBEEK, C. S. B.; KIM, S. J.; CHAULET, P., & NUNN, P. For WHO/IUATLD. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. *N Engl J Med*, 338(23):1641-1649, 1998.

PALOMINO, J.C, & PORTAELS, F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18:380-383, 1999.

PFYFFER, G. S.; BONATO, D. A.; EBRAHIMZADEH, A.; GROSS, W.; HOTALING, J.; KORNBLUM, J.; LAZLO, A.; ROBERTS, G.; SALFINGER, M.; WITTEWER, F. & SIDDQI, S. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the Proportion Method with solid media. *J Clin Microbiol*, 37(10):3179-3186, 1999.

PARK, Y. Z.; KIM, B. J.; RYU, S.; KOOK, Y. H.; CHOE, Y. K.; BAI, G. H. & KIM, S. J. Cross-resistance between rifampicin and KRM-1648 is associated with specific *rpoB* alleles in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 6(2):166-170, 2002.

PARK, H.; SONG, E. J.; SONG, E. S.; LEE, E. Y.; KIM C. M.; JEONG, S. H.; SHIN, J. H.; JEONG, J.; KIM, S.; PARK, Y. K.; BAI, G. & CHANG C. L. Comparison of a Conventional Antimicrobial Susceptibility Assay to an Oligonucleotide Chip System for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *J Clin Microbiol*, 44(5):1619–1624, 2006.

RAMASWAMY, S. V.; & MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuberc. Lung Dis*, 79:3–29, 1998.

RISKA, P .F.; SU, Y. A.; BARDAROV, S.; FREUNDLICH, L.; SARKIS, G.; HATFULL, G.; CARRIERE, C.; KUMAR, V.; CHAN, J. & JACOBS JR, W. R. Rapid film-based determination of antibiotic susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a Luciferase Reporter Phage and the Bronx Box. *J Clin Microbiol*, 37(4):1144-1149, 1999.

RODRIGUES V. F. S.; TELLES M. A.; RIBEIRO M. O.; CAFRUNE P. I.; ROSSETTI, M. L. R. & ZAHA A. Characterization of *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Antimicrobi Agents and Chemother*, 49(1)444–446, 2005.

ROSEMBERG J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Boletim de Pneumologia Sanitária*. Vol. 7 n^o 2 – jun/dez, 1999.

ROSSETTI M. L.; VALIM A. R.; SILVA M.S.& RODRIGUES V. S. Resistant tuberculosis: a molecular review. *Rev saude Pública*, 36(4):525-532, 2002.

SANDER P. & BÖTTGER E. C. Mycobacteria: Genetics of resistance and implications for treatment. *Chemotherapy*, 45: 95-108, 1999.

SCORPIO, A.; COLLINS, D. M.; WHIPPLE, D.; CAVE, D.; BATES, J. & ZHANG, Y. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J Clin Microbiol*, 32: 106-110, 1997.

SEKIGUCHI, J.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; AUGUSTYNOWICZ-KOPEC, E.; ZWOLSKA, Z.; KIRIKAE, F.; TOYOTA, E.; KOBAYASHI, I.; MORITA, K.; KUDO, K.; KATO, S.; KURATSUJI, T.; MORI, T.; & KIRIKAE1, T. Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 45:179-192, 2007.

SES-RS. Secretaria Estadual da Saúde, Estado do Rio Grande do Sul, Coordenação de Atenção Integral à Saúde, Coordenação de Pneumologia Sanitária, Tuberculose, 2007.

SHENG, J.; LI, J.; SHENG, G.; YU, H.; HUANG, H.; CAO, H.; LU, Y. & DENG SHENG, X. Characterization of *rpoB* mutations associated with rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from eastern China. *J Appl Microbiol*, 2008.

SHIMIZU, Y.; DOBASHI, K.; YOSHIKAWA, Y.; YABE, S.; HIGUCHI, S.; KOIKE, Y.; MITA, Y.; UTSUGI, M.; ENDOU, K.; TAKAHASHI, K.; WATANABE, S.;

SAITO, R. & MORI, M. Five-antituberculosis drug-resistance genes detection using array system. *J Clin Biochem Nutr*, 42, 228–234, 2008

SMITH C. V. & SACCHETTINI J. C. Mycobacterium tuberculosis: a model system for structural genomics. *Curr Opin Struct Biol*, 13(6):658-64, 2003.

SMITH, P. G.; & MOSS, A. R. Epidemiology of tuberculosis (chapter 4). In: Bloom, B. R. (Ed.). Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington. ASM Press, 1994.

SOINI, H., & MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clinical Chemistry*, 47(5):809-814, 2001.

SOMOSKOVI, A.; DORMANDY, J.; MITSANI, D.; RIVENBURG, J. & SALFINGER, M. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based Genotype MTBDR Assay for rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin *J Clin Microbiol*, 44:4459-4463, 2006.

SPIES F. S.; ALMEIDA DA SILVA P. E.; RIBEIRO M. O.; ROSSETTI M. L. & ZAHA A. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob Agents Chemother*. Jun 9. Epub ahead of print, 2008.

SPINDOLA DE MIRANDA, S.; KRITSKI, A. L.; FILLIOL, I.; MABILAT, C.; PANTEIX, G., & DROUET, E. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Brazil and France. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, 96(2):247-250, 2001.

STEAD, W. W. & DUTT, A. K. Epidemiology and host factor. In: Svhlossberg, D. *Tuberculosis*. 2^A ED. NEW YORK. 1989.

SRIVASTAVA K.; DAS R.; JAKHMOLA P.; GUPTA P.; CHAUHAN D. S.; SHARMA V. D.; SINGH H. B.; SACHAN A. S. & KATOCH V. M. Correlation of mutations detected by INNO-LiPA with levels of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res*, 120(2):100-5, 2004.

TAKIFF, H.E. The molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In I. Bastian & F. Portaels (ed). *Multidrug-resistant tuberculosis*. Klawer Academic Publishers, 2000.

TANIGUCHI, H.; ARAMAKI, H., & NIKAIDO, Y. Rifampin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*, 144:103-108, 1996.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; SCHIDHEINI, T., & BODMER, T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(10):2054-2058, 1993a.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; LOWRIE, D.; COLE, S. T.; COLSTON, M. J.; MATTER, L.; SCHOPPER, K., & BODMER, T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 341:647-650, 1993b.

TORTOLI, E.; BENEDETTI, M.; FONTNELLI, A.; & SIMONETTI, M. T. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion. *J Clin Microbiol*, 40(2):607-610, 2002.

TORTOLI E. & MARCELLI F. Use of the INNO LiPA Rif.TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26:51–55, 2007.

TRUJILLO, W. F. C., & KRITSKI, A.L. Tuberculose. In: Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. Ed. Cultura Médica, Rio de Janeiro, 2001.

VALIM, A. R. M.; ROSSETTI, M. L. R.; RIBEIRO, M. O. & ZAHA, A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Brazil. *J. Clin. Microbiol*, 38: 3119–3122, 2000.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HASS, P. E. I. HERMANS, P. W. M. & VAN EMBDEN, J. D. A. DNA Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol*, 235, 196-204, 1994.

VAN SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; DE HASS, P.E.W.; HERMANS, P.W.M.; KOEDAM, M.A.; TEPPEMA, K.S.; BRENNAN, P.J.; BESRA, G.S.; PORTAELS, F.; TOP, J.; SCHOULS, L.M. & VAN EMBDEN, J.D. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from África. *Int J Syst Bacteriol*, 47(4):1236-45, 1997.

VIEIRA R. C. A.; FREGONA G.; PALACI M.; DIETZE R.; MACIEL E. L. N. Perfil Epidemiológico dos casos de tuberculose multiresistente do Espírito Santo. *Rev bras Epidemiol*, 10(1):56-65, 2007

VIJDEA R.; STEGGER M.; SOSNOVSKAJA A.; ANDERSEN A. B.; THOMSEN V. O. & BANG D. Multidrug-resistant tuberculosis: rapid detection of resistance to rifampin and high or low levels of isoniazid in clinical specimens and isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Jun 5. Epub ahead of print, 2008.

YAM, W. C.; TAM, C. M.; LEUNG, C. C.; TONG, H. L.; CHAN, K. H.; LEUNG, E. T. Y.; WONG, K. C.; YEW, W. W.; SETO, W. H.; YUEN, K. Y.; & HO, P. L. Direct Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory Specimens by PCR-DNA Sequencing. *J Clin Microbiol*, 42:4438–4443, 2004

YANG, B.; OHNO, K.H.; OGAWA, H.; FUKUDA, K.; HIRAKATA, M.; MAESAKI, Y.; TOMONO, S.; TASHIRO, K. & KOHNO, S. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin, and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 42:621–628. 1998.

WAALER HT. Tuberculosis and poverty. *Int J Tuberc Lung Dis*, 6(9):745-6, 2002.

WATTERSON, S. A.; WILSON, S. M.; YATES, M. D. & DROBNIEWKSI, F. A. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 36(7):1969-73, 1998.

WILLIAMS, D. L.; WAGUESPACK, C.; EISENACH, K.; CRAWFORD, J. T.; PORTAELS, F.; SALFINGER, M.; NOLAN, C. M.; ABE, C.; STICH-GROH, V., & GILLIS, T. P. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(10):2380-2386, 1994.

WILLIAMS, D. L.; SPRING, L.; COLLINS, L.; MILLER, L. P.; HEIFETS, L. B.; GANGADHARAM, P. R. & GILLIS, T. P. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 42:1853–1857, 1998.

Wells, C. D.; Cegielski, J. P.; Nelson, L. J.; Laserson, K. F.; Holtz, T. H.; Finlay, A.; Castro, K. G. & Weyer, K. HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis: the perfect storm. *J Infect Dis*, 15;196 Suppl 1:S86-107, 2007.

WILLIAMS, D. L.; WAGUESPACK, C.; EISENACH, K.; CRAWFORD, J. T.; PORTAELS, F.; SALFINGER, M.; NOLAN, C. M.; ABE, C.; STICH-GROH, V., & GILLIS, T. P. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(10):2380-2386, 1994.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The WHO/IUALTD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Geneva, (WHO/TB/1997.229), 1997.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUALTD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Report 2: Prevalence and trends. (WHO/CDS/TB/2000.278). Geneva, 2000.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Anti-Tuberculosis drug resistance in the world. Report No.3. (WHO/CDS/TB/2004). Geneva. Switzerland, 2004.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report, 2008.

ZAGER, E. M. & MCNERNEY, R. Multidrug-resistant tuberculosis *BMC Infect Dis*. Jan 25;8:10, 2008.

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

ZHANG, Y. & TELENTI, A. Genetics of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, In: G. F. Harful & W. R. Jacobs Jr. (Ed). *Molecular Genetics of Micobactéria*. ASM Press, 2000.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45: 529-564, 2005.

9. ANEXOS

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Raquel de Abreu Maschmann

Nome em citações bibliográficas: MASCHMANN, Raquel de Abreu; MASCHMANN, RA

Nascimento: 16/02/1978 - Porto Alegre/RS - Brasil

Endereço profissional: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa Em Saúde

Avenida Ipiranga, 5400, Jardim Botânico - Porto Alegre

90610-000, RS - Brasil

Telefone: 51 33520336

e-mail para contato : raquel368@gmail.com

2. FORMAÇÃO E CURSOS

Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Mar/1996 -Set/2000.

Ênfase em Análises Clínicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Mar/2001 – Dez/ 2002

Formação complementar

Curso de curta duração em Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 2003.

3. ESTÁGIOS:

Laboratório Central de Saúde Pública, Centro de Saúde Vila dos Comerciários, estágio voluntário nos setores de bioquímica, hematologia, imunologia, biologia molecular, uroanálise, parasitologia, microbiologia nos períodos de março/96 a junho/96 (360 horas), dezembro/97 a março/98 (300 horas) e de junho/00 a fevereiro/01(960 horas).

Iniciação científica, bolsista CNPq por 17 meses, a contar de março/99, sob a orientação da professora Elaine Elisabetsky, para o desenvolvimento do projeto de pesquisa: “Avaliação neurofarmacológica e neuroquímica de plantas com vistas ao desenvolvimento de novas drogas psicoativas”.

4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

2006 - Atual

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

Vínculo: institucional

Enquadramento funcional: Farmacêutica-Bioquímica

Carga horária: 40hs

Regime: Integral

Outras informações: Desenvolvimento e validação de novos métodos diagnóstico para tuberculose e hepatite C.

2007

Atividade Didática na ULBRA, Canoas, RS, Jun/2007: Projeto de Extensão do Curso de Biomedicina intitulado Educação Continuada em Laboratório de Saúde Pública na Área de Epidemiologia e Pesquisa de Doenças Infecto-contagiosas - 15hs/aula.

2001 - 2005

Fundação Universitária de Endocrinologia e Fertilidade – FUEF

Vínculo: Celetista

Enquadramento funcional: Bioquímica

Carga horária: 30hs

Regime: Parcial

Atividades: Serviço Técnico Especializado, Laboratório de Análises Clínicas, Química

Especificação: realização de exames laboratoriais nas áreas de bioquímica, hematologia e imunologia.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. MASCHMANN, Raquel de Abreu, Verza, Mirela, SILVA, Marcia Suzana Nunes, ROSSETTI, Maria Lucia. Estocagem e Transporte de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*. In: 44° Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2008, Porto Alegre. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2008.
2. MASCHMANN, Raquel de Abreu, Verza, Mirela, SPERHACKE, R. D., SILVA, Marcia Suzana Nunes, ZAHA, A., ROSSETTI, Maria Lucia. Detecção de mutações no gene *rpoB* pela técnica de hibridização reversa. In: 24° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2007.

3. Verza, Mirela, MASCHMANN, Raquel de Abreu, SPERHACKE, R. D., SILVA, Marcia Suzana Nunes, RIBEIRO, Marta Osorio, ZAHA, A., ROSSETTI, Maria Lucia. Identificação da mutação do codon 315 (AGC-ACC) no gene katG em *Mycobacterium tuberculosis*. In: 24° Congresso Brasileiro de microbiologia, 2007, Brasília. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2007.
4. Verza, Mirela, MASCHMANN, Raquel de Abreu, SILVA, Marcia Suzana Nunes, ROSSETTI, Maria Lucia. Detecção molecular de resistência à isoniazida em isolados de *Mycobacterium tuberculosis*. In: II Encontro Nacional de Tuberculose, 2006, São Paulo. Jornal Brasileiro de Pneumologia. , 2006. v.32. p.142 - 142
5. MASCHMANN, Raquel de Abreu, Verza, Mirela, SILVA, Marcia Suzana Nunes, ROSSETTI, Maria Lucia. Detecção de mutações no gene rpoB em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistente. In: II Encontro Nacional de Tuberculose, 2006, São Paulo. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2006. v.32. p.142 - 143
6. COSTA, Elis Regina Dalla, MASCHMANN, Raquel de Abreu, RIBEIRO, Marta Osorio, SILVA, Marcia Suzana Nunes, KRITSKI, Afranio, ROSSETTI, Maria Lucia. Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Resistant Isolates from Brazil and Argentina. In: 35° UNION World Conference on Lung Health, 2004, Paris. Livro de resumos, 2004.
7. COSTA, Elis Regina Dalla, MASCHMANN, Raquel de Abreu, SILVA, Marcia Suzana Nunes, RIBEIRO, Marta Osorio, KRITSKI, Afranio, ROSSETTI, Maria Lucia. Mutations In: *Mycobacterium tuberculosis* Genes Associated with Isoniazid Resistance Isolates from Brazil. In: I Encontro Nacional de Tuberculose, 2004, Brasília. Livro de Resumos, 2004.
8. MASCHMANN, Raquel de Abreu, COSTACAMPOS, Luciane, ELIZABETKY, Elaine. Efeitos da Alstonina na atividade locomotora e coordenação motora de camundongos In: XI Salão de Iniciação Científica, 1999, Porto Alegre. Editora da UFRGS, 1999. v.XI. p.122 - 125

Trabalho apresentado no salão de iniciação científica, obtendo destaque