

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Construção de um painel com isolados clínicos de
Mycobacterium tuberculosis com genes de resistência a
quimioterápicos, para o estudo de novas drogas anti-TB

Marcelo Miyata

ARARAQUARA

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Construção de um painel com isolados clínicos de
Mycobacterium tuberculosis com genes de resistência a
quimioterápicos, para o estudo de novas drogas anti-TB

Marcelo Miyata

Área de concentração: Microbiologia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite

Co-Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

ARARAQUARA

2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M618c Miyata, Marcelo
Construção de um painel com isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* com genes de resistência a quimioterápicos, para o estudo de novas drogas anti-TB / Marcelo Miyata. – Araraquara, 2010
119 f. + anexo

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Clarice Queico Fujimura Leite
Co-orientador: Cleslei Fernando Zanelli

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Tuberculose. 3. DNA. 4. Novas drogas. I. Leite, Clarice Queico Fujimura, orient. II. Zanelli, Cleslei Fernando, co-orient.. III. Título.

CAPES: 40300005

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

Dra. Daisy Nakamura Sato

Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

ARARAQUARA

2010

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo
À Deus, Seu Zé e Dona Cleide
À minha família Roberto, Nadir e Simone
À Nathália de Paula

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, ao Seu Zé e à Dona Cleide pela ajuda espiritual em todos os momentos, seja no âmbito pessoal ou profissional.

Agradeço à Profa. Clarice Queico pela possibilidade de desenvolver este trabalho e por acreditar no meu potencial.

Agradeço ao Prof. Cleslei Fernando Zanelli pela co-orientação e ao Dr. José Rodrigo Pandolfi pela ajuda na transferência de laboratório.

Agradeço à Nathália de Paula, pelo companheirismo, amizade, paciência, equilíbrio e apoio em todos os momentos.

Agradeço aos amigos Fernando, pela ajuda na realização do REMA e Adolfo pela ajuda nas extrações e repiques dos isolados e aos amigos de laboratório, Natália, Marcio, Leonardo, Letícia, Malu e Rodrigo, pelos momentos dentro e fora do laboratório.

Agradeço à Dra. Daisy Nakamura Sato pela amizade e pela orientação na realização do REMA.

Agradeço à Profa. Regina Frem e à Patrícia Bento pelo fornecimento dos compostos com INH e RMP.

Agradeço ao Dr. Fernando Fiúza de Melo pelo fornecimento dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* MDR.

Agradeço à Profa. Rosilene Fressatti Cardoso pela orientação na escolha dos primers para a realização da PCR-SSCP e ao Prof. Mario Hirata pelo fornecimento do equipamento e dos géis para a realização da PCR-SSCP.

“Somos uma temível mistura de ácidos nucléicos e lembranças, de desejos e de proteínas. O século que termina ocupou-se muito de ácidos nucléicos e de proteínas. O seguinte vai concentrar-se sobre as lembranças e os desejos.

Saberá ele resolver essas questões?”

"O Ratinho, a Mosca e o Homem", do biólogo e geneticista francês

François Jacob

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde em 2009, 9,27 milhões de novos casos de tuberculose ocorreram em 2007. Destes novos casos, 4,9% eram multidroga resistentes. Muitas pesquisas são realizadas na procura de novas drogas com atividade contra o bacilo da tuberculose, havendo então a necessidade de se entender os mecanismos de ação destes novos compostos. Este projeto objetivou propiciar ferramentas para compreender um pouco mais sobre os mecanismos de ação de novas drogas. Isolados clínicos de *M. tuberculosis* foram caracterizados quanto ao seu perfil de susceptibilidade aos fármacos do esquema terapêutico e foram determinadas as mutações responsáveis por estas resistências. Com os isolados caracterizados, foi construído um painel de *M. tuberculosis*. Pelo REMA, os isolados foram analisados quanto ao seu perfil de susceptibilidade aos fármacos (INH, RMP, STR e ETB) e avaliados quanto à presença de mutações nos genes de resistência (*inhA*, *katG*, *ahpC*, *rpoβ*, *rpsL*, *rrs* e *embB*) empregando a PCR-SSCP. Pelo REMA foram avaliados 80 isolados clínicos, sendo observada a resistência a INH em 74,7%, a RMP em 51,2%, a STR em 53,7% e ao ETB em 58,7%. Nos isolados resistentes, a porcentagem de mutações encontradas nos genes foi de 20,6% para *inhA*, 50% para *katG*, 6,3% para *ahpC*, 60% para *rpoβ*, 20% para *rpsL* e 0% para *rrs* e *embB*. Um painel com 12 isolados foi testado frente a três novos compostos, dois derivados de INH (Cu-INH₁ e Cu-INH₂) e um de RMP (Cu-RMP). Verificou-se que os isolados resistentes a INH foram também resistentes a Cu-INH₁ e Cu-INH₂. A mesma situação foi verificada em relação à RMP, com o composto Cu-RMP. Provavelmente, estes novos compostos têm os mesmos mecanismos de ação da INH e da RMP, que são os fármacos que lhes deram origem.

ABSTRACT

According to World Health Organization in 2009, 9.27 million new TB cases occurred in 2007. Among these new cases, 4.9% were multidrug resistant. Many surveys are conducted in the search for new drugs with activity against the tuberculosis bacillus, therefore there is a need to understand the action mechanism of these new compounds. This project aimed to provide tools to understand about the action mechanisms of new drugs. *M. tuberculosis* clinical isolates were analyzed for their susceptibility profile to drugs, mutations responsible for resistance and a panel of these characterized isolates. The isolates were analyzed for susceptibility profile to drugs (INH, RIF, STR and ETB) and evaluated for presence of mutations in the resistance genes (*inhA*, *katG*, *ahpC*, *rpoβ*, *rpsL*, *rrs* and *embB*) applying the PCR-SSCP. REMA evaluated 85 clinical isolates and the resistance was observed in 74.7% to INH, 51.5% to RIF, 53.7% to STR and 58.7% to ETB. In the resistant isolates, percentage of mutations found in the genes was 20.6% for *inhA*, 50% for *katG*, 6.3% for *ahpC*, 60% for *rpoβ*, 20% for *rpsL* and 0% for *rrs* and *embB*. A panel of 12 isolates was tested against three new compounds, two INH-derivatives (Cu-INH₁ and Cu-INH₂) and one RMP-derivative (Cu-RMP). The isolates resistant to INH were also resistant to Cu-INH₁ and Cu-INH₂ compounds. The same situation was verified in relation to the RMP with the Cu-RMP compound, indicating that probably these three new compounds have the same action mechanism of INH and RMP drugs.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. a) Diluição inicial das soluções no meio de cultura Middlebrook 7H9 de maneira a obter concentrações variáveis ($\mu\text{g/mL}$) dos fármacos. b) Diluição posterior das soluções no meio de cultura Middlebrook 7H9 de maneira a se obter concentrações variáveis maiores ($\mu\text{g/mL}$) somente dos fármacos INH e RMP.....	38
Tabela 2. Iniciadores utilizados para a amplificação de cada gene com a respectiva temperatura de hibridização e tamanho do produto amplificado	46
Tabela 3. Condições eletroforéticas para cada um dos genes.....	48
Tabela 4. Teste de sensibilidade de 57 isolados clínicos sensíveis, mono e MDR-TB comparando o método BACTEC TM MGIT TM 960 com o REMA.....	56
Tabela 5. Perfis de susceptibilidade de 80 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> frente aos fármacos do esquema terapêutico apresentando-os isoladamente ou de forma combinada (2 fármacos, 3 fármacos, 4 fármacos).....	61
Tabela 6. Resultado da PCR-SSCP com os genes correspondentes a cada fármaco e a taxa de mutação encontrada nos isolados clínicos para cada gene e total de isolados	64
Tabela 7. Resultado da PCR-SSCP nos genes de resistência (<i>katG</i> , <i>inhA</i> e <i>ahpC</i>) indicando a taxa de mutação encontrada nos isolados classificados como de baixa e de alta resistência à INH.....	65
Tabela 8. Resultado da PCR-SSCP no gene de resistência <i>rpoβ</i> indicando a taxa de mutação encontrada nos isolados classificados como de alta resistência à RMP	66
Tabela 9. Resultado da PCR-SSCP nos genes de resistência (<i>rpsL</i> e <i>rrs</i>) indicando a taxa de mutação encontrada nos isolados classificados como de alta resistência à STR.....	67

Tabela 10. Resultados de CIM, SSCP e sequenciamento dos 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis* que compõem o painel 68

Tabela 11. Resultados expressos em valores de CIM da resistência aos fármacos dos 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis* do painel. 73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Placa de 96 orifícios revelando o perfil de resistência/sensibilidade e CIM pela técnica do REMA. Nas colunas 1 e 12 foi adicionada água e na coluna 11 foram adicionados os controles positivo e negativo. 40
- Figura 2. Esquema ilustrando as regiões selecionadas, com os respectivos iniciadores, para a triagem das mutações dentro de cada gene. (a) região promotora do gene *inxA*; (b) região promotora do gene *katG*; (c) região promotora do gene *ahpC*; (d) região promotora do gene *rpoβ*; (e) região promotora do gene *rpsL*; (f) região promotora do gene *rrs*; (G) região promotora do gene *embB*..... 45
- Figura 3. Resultado da identificação molecular, apresentando os fragmentos gerados pela PCR no tamanho de 245 pb..... 51
- Figura 4. Resultado da amplificação do gene *hsp65*, apresentando os fragmentos amplificados pela PCR no tamanho de 430 pb. 52
- Figura 5. Resultado da identificação utilizando a técnica do PRA, apresentando os fragmentos digeridos pelas enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*, com os respectivos tamanhos em pb. ... 53
- Figura 6. Comparação entre BACTEC™ MGIT™ 960 e REMA para cada fármaco, ilustrando amostras concordantes () e amostras discordantes (). (a) Correlação para INH. (b) Correlação para RMP. (c) Correlação para STR. (d) Correlação para ETB. 56
- Figura 7 - Curva ROC da INH determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e ponto de corte. 57
- Figura 8 - Curva ROC da RMP determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e ponto de corte. 58

Figura 9 - Curva ROC da STR determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e ponto de corte.	59
Figura 10 - Curva ROC do ETB determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e ponto de corte.	59
Figura 11a. Gel de SSCP para o gene <i>inhA</i> ilustrando com asterisco o isolado com mutação, utilizando como referência a cepa padrão <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv.	62
Figura 11b. Gel de SSCP para o gene <i>katG</i> ilustrando com asterisco os isolados com mutação, utilizando como referência a cepa padrão <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv.	63
Figura 11c. Gel de SSCP para o gene <i>ahpC</i> ilustrando com asterisco o isolado com mutação, utilizando como referência a cepa padrão <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv.	63
Figura 12. Gel de SSCP para o gene <i>rpoB</i> ilustrando com asterisco os isolados com mutação, utilizando como referência a cepa padrão <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv.	63
Figura 13a. Gel de SSCP para o gene <i>rpsL</i> ilustrando com asterisco os isolados com mutação, utilizando como referência a cepa padrão <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv.	63
Figura 13b. Gel de SSCP para o gene <i>rrs</i> ilustrando os isolados sem mutação, utilizando como referência a cepa padrão <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv.	64
Figura 14. Gel de SSCP para o gene <i>embB</i> ilustrando os isolados sem mutação, utilizando como referência a cepa padrão <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv.	64
Figura 15. Seqüenciamento ilustrando a mutação CGA > TGA no gene <i>inhA</i> em um isolado.	69
Figura 16a. Seqüenciamento ilustrando a mutação AGC > ACC no gene <i>katG</i> em sete isolados.	69

Figura 16b. Seqüenciamento ilustrando a mutação AGC > AGA no gene <i>katG</i> em um isolado.	69
Figura 17a. Seqüenciamento ilustrando a mutação ATT > ATC no gene <i>ahpC</i> em um isolado.	70
Figura 17b. Seqüenciamento ilustrando a mutação CAC > TAC no gene <i>ahpC</i> em um isolado.	70
Figura 18a. Seqüenciamento ilustrando a mutação CCA > CTG no gene <i>rpoβ</i> em um isolado.	71
Figura 18b. Seqüenciamento ilustrando a mutação GTC > GTT no gene <i>rpoβ</i> em sete isolados.	71
Figura 18c. Seqüenciamento ilustrando as mutações CCA > GCC e CAA > CCA no gene <i>rpoβ</i> em um isolado.	71
Figura 18d. Seqüenciamento ilustrando a mutação GGA > GGT no gene <i>rpoβ</i> em um isolado.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

SSCP - Single Strand Polimorphism Conformation

MDR - Multi Droga Resistente

PRA - PCR Restriction Enzyme Analysis

REMA - Resazurin Microtiter Assay

CIM - Concentração Inibitória Mínima

MABA - Microplate Alamar Blue Assay

ROC - Receiver Operating Characteristic

INH - Isoniazida

RMP - Rifampicina

STR - Streptomicina

ETB - Etambutol

Cu - Cobre

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Fármacos do esquema terapêutico.....	23
1.1.1. Isoniazida (INH)	23
1.1.2. Rifampicina (RMP).....	24
1.1.3. Estreptomicina (STR).....	25
1.1.4. Etambutol (ETB)	27
1.1.5. Pirazinamida (PZA).....	28
1.2. Determinação das mutações gênicas responsáveis pela resistência	28
1.2.1. PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism).....	28
1.2.2. Sequenciamento de DNA.....	29
1.3. Determinação da atividade antimicobacteriana dos fármacos e de novas drogas.....	30
1.3.1. REMA (Resazurin Microtiter Assay Plate).....	30
1.4. Construção de um painel de isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	31
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivos específicos	32
2.1.1. Identificação molecular dos isolados clínicos de 106 amostras de <i>M. tuberculosis</i> empregando PCR-IS6110 e/ou PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis)	32
2.1.2. Determinação dos valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de 80 isolados de <i>M. tuberculosis</i> frente aos fármacos (INH, RMP, STR e ETB) utilizando o REMA	32
2.1.3. Comparação do REMA com o BACTEC e determinação da curva ROC.....	32
2.1.4. Triagem de mutações associadas com resistência a fármacos utilizando a técnica do PCR-SSCP	32
2.1.5. Seqüenciamento dos 12 isolados clínicos selecionados para compor o painel	32
2.1.6. Construção do painel com 12 isolados clínicos resistentes caracterizados quanto ao perfil de resistência a INH e RMP e à presença de mutações responsáveis pela resistência	32

2.1.7. Determinar o valor da CIM dos compostos Cu-INH ₁ , Cu-INH ₂ e Cu-RMP empregando os 12 isolados clínicos do painel com resistência a INH e/ou RMP	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Isolados clínicos.....	33
3.2. Identificação molecular de <i>M. tuberculosis</i>	33
3.2.1. Extração do DNA genômico de <i>M. tuberculosis</i>	33
3.2.2. Quantificação do DNA genômico de <i>M. tuberculosis</i>	34
3.2.3. Identificação molecular de <i>M. tuberculosis</i> utilizando a PCR- IS6110.....	34
3.2.4. Identificação molecular de <i>M. tuberculosis</i> utilizando a técnica da PCR-Restriction Enzyme Analysis (PRA).....	36
3.3. Determinação dos valores de CIM nos isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> frente aos fármacos INH, RMP, STR e ETB.....	37
3.3.1. Fármacos utilizados no estudo e suas diluições	37
3.3.2. Preparo das suspensões bacterianas dos 80 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> e da cepa padrão <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	38
3.3.3. Determinação do valor de CIM frente aos fármacos dos 80 isolados de <i>M. tuberculosis</i> utilizando a técnica do REMA	39
3.3.4. Análise estatística e determinação da curva ROC e valor do ponto de corte	41
3.3.5. Sensibilidade, especificidade e acurácia do REMA	41
3.4. Triagem das mutações associadas à resistência aos fármacos utilizando PCR-SSCP.....	42
3.5. Sequenciamento dos genes dos isolados clínicos selecionados.....	49
3.6. Escolha dos isolados clínicos para avaliação dos compostos Cu-INH ₁ , Cu-INH ₂ e Cu-RMP.....	50
4. RESULTADOS	51
4.1. Identificação molecular dos isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	51
4.2. Determinação dos valores de CIM dos fármacos testados nos isolados de <i>M. tuberculosis</i>	54
4.2.1. Determinação da curva ROC, do valor do ponto de corte e da sensibilidade e especificidade da técnica do REMA	54
4.2.2. Sensibilidade e especificidade do REMA frente aos fármacos e cálculo da área sob a curva.....	57
4.2.4. Determinação do perfil de susceptibilidade aos fármacos de 80 isolados clínicos	60
4.3. Triagem das mutações utilizando PCR-SSCP	62
4.3.1. Isoniazida.....	64
4.3.2. Rifampicina	66

4.3.3. Estreptomicina	66
4.3.4. Etambutol.....	67
4.4. Montagem do painel e seqüenciamento dos isolados clínicos que compõem o painel.....	67
4.4.1. <i>inhA</i>	69
4.4.2. <i>katG</i>	69
4.4.3. <i>ahpC</i>	70
4.4.4. <i>rpoβ</i>	70
4.5. Determinação dos valores de CIM dos compostos Cu-INH ₁ , Cu-INH ₂ e Cu-RMP empregando os 12 isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> do painel	71
5. DISCUSSÃO.....	74
6. CONCLUSÕES.....	92
7. PUBLICAÇÕES.....	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
9. APÊNDICES.....	120

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* surgiu aproximadamente há 150 milhões de anos e o antecessor de *M. tuberculosis* provavelmente surgiu no leste da África, há 35 mil anos, dando origem às linhagens atuais, que foram documentadas no Egito, Índia e China há 5000, 3300 e 2300 anos atrás, respectivamente (DANIEL, 2006). A doença denominada de tuberculose (TB), causada por *M. tuberculosis*, era comumente chamada de “praga branca” e foi um problema de saúde muito sério nos séculos 18, 19 e início do século 20.

No final da década de 90, acreditava-se que a tuberculose (TB) estava sob controle, mas ocorreu um aumento do número de casos de TB e de TB associada ao HIV. Grande parte deste aumento foi atribuída ao impacto da epidemia de HIV/AIDS, à deterioração das condições sócio-econômicas e à desestruturação dos sistemas de saúde, resultando em elevadas taxas de mortalidade, que são reflexos do uso inadequado dos fármacos, diagnóstico demorado e facilidade de transmissão em locais pouco ventilados (CONDE *et al.* 2002).

O controle da tuberculose depende de um diagnóstico rápido e de um tratamento efetivo. No tocante ao diagnóstico, este deve ser realizado através do cultivo e de provas bioquímicas, porém o diagnóstico laboratorial pode demorar devido ao crescimento lento de *M. tuberculosis* (4 a 8 semanas) (FRIEDEN *et al.* 2003). Neste sentido, técnicas moleculares têm sido propostas para contornar este problema. Dentre elas podem ser citadas duas técnicas de identificação molecular baseadas em PCR. A primeira é a amplificação do transposon IS6110, cuja seqüência é relacionada à família IS3 de seqüências de inserção, que foram descobertos inicialmente em membros da família *Enterobacteriaceae* (van EMBDEN *et al.* 1993), possibilitando a identificação também de espécies de micobactérias, sendo o IS6110 detectado somente em espécies pertencentes ao

complexo *M. tuberculosis* (THIERRY *et al.* 1990). A segunda é a PCR-PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis), que se baseia na amplificação do gene *hsp65*, um gene altamente conservado e que codifica uma proteína de choque térmico de 65-kDa (TELENTI *et al.* 1993), que contém epítomos comuns a várias espécies de micobactérias (SCHINNICK *et al.* 1987), seguida de uma fase de digestão do fragmento e por final uma análise dos fragmentos digeridos, permitindo a identificação das micobactérias em nível de espécie (TELENTI *et al.* 1993).

Em relação ao tratamento, com o advento de terapia à base de antibióticos nos anos 50, houve um declínio nos casos de tuberculose, mas no final dos anos 80, houve um ressurgimento da TB nos países desenvolvidos assim como nos países em desenvolvimento (BLOOM, 1992). A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 2 bilhões de pessoas estejam infectadas por *M. tuberculosis*, o que corresponde a um terço da população mundial, ocorrendo 9,27 milhões de novos casos de tuberculose e 2 milhões de mortes por ano (WHO, 2009). No Brasil, o sistema de tratamento para a TB recomendado pelo PNCT/MS desde 1979, está sendo atualmente modificado (BRASIL, 2002). Anteriormente, o esquema de tratamento básico consistia na quimioterapia de curta duração durante seis meses, que incluía rifampicina (RMP), isoniazida (INH) e pirazinamida (PZA) durante os primeiros dois meses na fase de tratamento intensivo, seguidos de RMP e INH durante os próximos quatro meses na fase de continuação. Atualmente, o PNCT/MS introduziu um quarto fármaco, o etambutol (ETB), na fase de ataque e adotou a associação dos fármacos em forma de comprimidos, com doses fixas combinadas 4 em 1 (INH, RMP, PZA e ETB) para a fase de tratamento intensivo, e 2 em 1 (RMP e INH) para a fase de continuação. Esse esquema básico é indicado para todos os casos novos de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar (exceto meningoencefalite), bem

como para todos os casos de recidiva e retorno após abandono (CONDE *et al.* 2009). O esquema de tratamento, no caso de falência do esquema básico, seja por resistência à RMP e INH ou RMP, INH e mais outro fármaco de primeira linha, ou pela impossibilidade de uso do esquema básico por intolerância a dois ou mais medicamentos, é composto por cinco medicamentos: (estreptomicina (STR), etambutol (ETB), ofloxacina, pirazinamida e terizidona) durante seis meses na fase intensiva e três medicamentos durante 12 meses na fase de manutenção (etambutol, ofloxacina e terizidona), totalizando uma duração de 18 meses (CONDE *et al.* 2009).

A resistência natural aos fármacos presente no *M. tuberculosis* é uma barreira para o tratamento e controle da tuberculose. Essa resistência é atribuída ao seu envelope celular em múltiplas camadas e a um sistema de efluxo multidroga ativo (de ROSSI *et al.* 2006; PALOMINO *et al.* 2007). Estudos têm revelado a existência de outros sistemas que neutralizam a ação tóxica dos fármacos, assim como a aquisição de mutações cromossomais, e que por sua vez fornecem altos níveis de resistência (RAMÓN-GARCÍA *et al.* 2009). Fármacos que inibam estes sistemas capacitariam muitos antibióticos, dando um novo potencial no combate ao *M. tuberculosis* (LOMOVSKAYA & BOSTIAN, 2006).

Ao contrário de outras espécies bacterianas, que adquirem a resistência predominantemente por meio de plasmídeos e transposons, *M. tuberculosis* adquire a resistência com a ocorrência de mutações espontâneas nos genes cromossomais (HEYM *et al.* 1994) em uma frequência de 10^{-6} a 10^{-8} replicações micobacterianas (ZHANG & YEW, 2009). Neste sentido, o transposon IS6110 atua em *M. tuberculosis* gerando variação fenotípica através da sua atividade de transposição, e o número de cópias de IS6110 dentro do genoma possibilita uma vantagem seletiva que auxilia na sua virulência

(McEVOY *et al.* 2007). Devido ao fato destas mutações não apresentarem correlação, a frequência do desenvolvimento dessa resistência aumenta para 10^{-18} a 10^{-20} , quando três fármacos são usados simultaneamente (ZHANG & YEW, 2009), de acordo com o tratamento preconizado pela Organização Mundial da Saúde.

Alguns fatores como fornecimento irregular de fármacos, prescrição médica inapropriada e, o mais importante, pobre adesão do paciente ao tratamento (VARELDZIS *et al.* 1994), propiciam o surgimento de cepas multifármacos resistentes (MDR), que são resultantes do acúmulo de mutações em diferentes genes envolvidos na resistência a fármacos individuais (ZHANG & TELENTI, 2000). São consideradas MDR, as cepas de *M. tuberculosis* resistentes simultaneamente pelo menos à INH e à RMP (WHO, 2009). Devido ao número crescente de isolados clínicos de *M. tuberculosis* MDR, torna-se necessário e urgente, a pesquisa de novos fármacos na terapia da tuberculose. Entendendo os mecanismos da resistência micobacteriana, é possível desenvolver testes mais rápidos de diagnóstico molecular, e delinear novas drogas anti-tuberculose (ZHANG, 2005), bem como auxiliar a implementação de medidas para prevenir o desenvolvimento de tais resistências (ZHANG & YEW, 2009).

Um novo fármaco ideal deve encurtar o tratamento, matar o bacilo persistente e ser ativo contra linhagens resistentes. Além disso, ele deve ser específico para *M. tuberculosis*, ser compatível com os fármacos já existentes e não interferir com outros medicamentos (ZHANG & AMZEL, 2002). O desenvolvimento de novos fármacos para a tuberculose usando moléculas já conhecidas é uma das estratégias, que pode ser considerada atrativa do ponto de vista econômico, farmacêutico e clínico. Muitos análogos e derivados dos principais fármacos antituberculose estão sendo estudados com resultados

preliminares promissores (PALOMINO *et al.* 2007). A molécula de INH incorporada dentro do núcleo pirazolina mostrou atividade promissora contra *M. tuberculosis* (PALOMINO *et al.* 2007), e dois outros compostos (2-clorofenil e 4-fluorofenil) com halogênio substituindo o grupo fenil, mostraram uma atividade duas vezes maior do que da isoniazida contra *M. tuberculosis*, apresentando valor de CIM ao redor de 0,26 μ M (SHAHARYAR *et al.* 2006). Numerosos análogos de INH foram sintetizados para encontrar novos compostos com atividade contra o *M. tuberculosis* (MACCARI *et al.* 2002). Os compostos derivados de INH foram considerados os mais promissores, demonstrando excelente atividade contra os bacilos localizados dentro de macrófagos, devido ao aumento da lipofilicidade destes derivados, facilitando a sua entrada no bacilo, e conseqüentemente, tornando o *M. tuberculosis* mais susceptível a esta droga (MACCARI *et al.* 2005).

Outra estratégia utilizada no desenvolvimento de novos fármacos para a tuberculose é a de descobrir novos alvos a serem utilizados na terapêutica, visando superar a problemática da resistência. Um possível alvo pode ser as isocitrato liases, onde Muñoz-Elías & McKinney (2005) demonstraram que bactérias que perdem estas enzimas são incapazes de crescer em macrófagos e são rapidamente eliminadas dos pulmões de camundongos infectados. Outro alvo pode ser polissacarídeos da parede celular micobacteriana que desempenham diversas funções na interação bactéria-hospedeiro (GILLERON *et al.* 2008; MURPHY & BROWN, 2008). Muitos estudos como a descoberta de novas enzimas, a caracterização de alvos de fármacos conhecidos, composições de análogos de substratos e o desenvolvimento de ensaios em larga escala para a varredura de bibliotecas de compostos, contribuem para a descoberta e caracterização de enzimas, que podem ser alvos atrativos para ação tuberculostática (UMESIRI *et al.* 2010).

1.1. Fármacos do esquema terapêutico

1.1.1. Isoniazida (INH)

A INH, desde o seu descobrimento em 1952, é o fármaco de primeira linha mais amplamente usado para o tratamento da tuberculose doença e infecção latente (ZHANG & YEW, 2009). *M. tuberculosis* na sua forma ativa é altamente susceptível à INH, em um valor de CIM de 0,02 a 0,2 µg/ml. Entretanto, na sua forma latente (não replicante) ou sob condições anaeróbicas (ZHANG & YEW, 2009), o bacilo é resistente. A INH é um pro-fármaco que requer um processamento pela enzima catalase-peroxidase (traduzida pelo gene *katG*) para se tornar ativa. O radical acil-isonicotínico, derivado da ativação mediada pela KatG, reage com o NAD (nicotinamida adenine dinucleotídeo) para formar uma INH-NAD adulta (ROZWARSKI *et al.* 1998; RAWAT *et al.* 2003). Este complexo tem como alvo primário de inibição a enzima InhA (enoil ACP redutase), que está envolvida na elongação de ácidos graxos que ocorre na síntese de ácidos micólicos (BANERJEE *et al.* 1994), os quais são componentes essenciais da parede celular micobacteriana (PALOMINO *et al.* 2007), assim como DNA, carboidratos, lipídeos e metabolismo do NAD (CARDOSO *et al.* 2004).

Isolados clínicos de *M. tuberculosis* que apresentam resistência à INH, frequentemente perdem a função da enzima catalase-peroxidase (MIDDLEBROOK, 1954), especialmente linhagens com altos níveis de resistência (MIC > 5 µg/ml) (WINDER, 1982). Linhagens com baixo nível de resistência (MIC < 1 µg/ml) frequentemente ainda possuem algum nível de atividade catalítica (WINDER, 1982). A resistência à INH ocorre na frequência de 1 em 10⁵⁻⁶ bacilos *in vitro* (WINDER, 1982). Essa resistência é associada principalmente com mutações ou deleções no gene *katG* (ZHANG *et al.* 1992),

que são responsáveis por 60-80% da resistência. A mutação mais freqüente se localiza no códon 315 AGC > ACC (Ser > Thr) (RAMASWAMY & MUSSER, 1998; ZHANG & TELENTI, 2000; HERRERA *et al.* 2004; CARDOSO *et al.* 2004). Mutações na região intergênica *oxyR-ahpC* são consideradas mecanismos compensatórios para a perda da atividade enzimática de *katG* nas linhagens resistentes (SHERMAN *et al.* 1999; RAMASWAMY & MUSSER, 1998). Cerca de 10-15% dos isolados possuem mutações nessa região (KELLEY *et al.* 1997; RINDER *et al.* 1997; SREEVATSAN *et al.* 1997; CARDOSO *et al.* 2004). A relação entre o gene *ahpC* e a resistência à INH foi demonstrada nas linhagens resistentes a este fármaco, que perdem ou diminuem a atividade catalítica devido à alteração do gene *katG* (SHERMAN *et al.* 1999). Outras mutações podem ocorrer na região codificante ou no promotor do gene *inhA* (RAMASWAMY *et al.* 2003), causando super-expressão de InhA, ou por mutações no sítio ativo de InhA, diminuindo a afinidade de InhA à INH-NAD adulta (ROZWARSKI *et al.* 1998; BANERJEE *et al.* 1994). Mutações nessas regiões estão geralmente associadas com baixo nível de resistência (CIM = 0,2-1 µg/ml) e são menos freqüentes do que mutações em *katG* (ZHANG & TELENTI 2000; HAZBON *et al.* 2006). Segundo Cardoso *et al.* (2004) 20-35% dos isolados apresentam mutações na região regulatória *inhA*. Isolados clínicos de *M. tuberculosis* que possuem simultaneamente mutações em *inhA*, somadas a mutações em *katG*, conferem altos níveis de resistência à INH (HEYM *et al.* 1995).

1.1.2. Rifampicina (RMP)

RMP é outro fármaco importante de primeira linha para o tratamento da TB, sendo bactericida para *M. tuberculosis*, nos valores de CIM variando de 0,05 a 1 µg/ml em meio sólido ou líquido (MITCHISON, 1985). A RMP

interfere na síntese de RNA através da sua ligação à subunidade β da RNA polimerase, onde o sítio de ligação está localizado anteriormente ao centro catalítico e bloqueia fisicamente a elongação da cadeia de RNA. A RNA polimerase é um oligômero constituído de uma enzima *core* formada por quatro cadeias $\alpha_2\beta\beta'$ em associação com a subunidade σ para iniciar especificamente a transcrição a partir do reconhecimento dos promotores (ZHANG & YEW, 2009).

Quase todas as linhagens de *M. tuberculosis* resistentes à RMP mostram mutações no gene *rpo β* em uma frequência de 10^{-7} a 10^{-8} na população bacteriana (TELENTI *et al.* 1993). Este gene codifica a subunidade β da RNA polimerase, resultando em uma mudança conformacional que determina uma menor afinidade desta subunidade à RMP e, conseqüentemente, resistência ao fármaco (JIN & GROSS, 1988), resultando em um alto nível de resistência (CIM > 32 $\mu\text{g/ml}$) (TELENTI *et al.* 1993). Alta resistência é derivada de mutações que ocorrem geralmente na região denominada de *hot spot* no gene *rpo β* (TELENTI *et al.* 1993; RAMASWAMY & MUSSER, 1998), onde são encontradas em 96% dos isolados (TELENTI *et al.* 1993). Mutações conferindo resistência são agrupadas em três regiões pequenas na porção central do gene *rpo β* : *cluster* I (aminoácidos de 512 a 534), *cluster* II (aminoácidos de 563 a 574) e *cluster* III (aminoácidos 687) (ZHANG & TELENTI, 2000), onde as mutações nos códons 531, 526 e 516 estão entre as mais frequentes nos isolados resistentes (BODMER *et al.* 1995).

1.1.3. Estreptomicina (STR)

STR apesar de ser utilizada somente no esquema terapêutico em casos de falência do esquema básico foi inclusa neste estudo pelo fato de possuir dados de resistência fornecidos pelo Instituto Clemente Ferreira. STR é um

aminoglicosídeo ativo contra uma variedade de espécies bacterianas, incluindo *M. tuberculosis*. O fármaco é ativo contra bacilos replicantes, apresentando valor de CIM de 2-4 µg/ml (HEIFETS, 2005), mas é inativo contra bacilos intracelulares ou em latência (MITCHISON, 1985). A STR inibe a síntese de proteínas através da sua ligação à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, causando um erro de leitura do RNAm durante a tradução (DAVIES *et al.* 1965). Especificamente na subunidade 30S, a STR liga-se à proteína ribossomal S12 ou ao RNAr 16S (FINKEN *et al.* 1993).

Mutações associadas com resistência a STR em *M. tuberculosis* foram identificadas no gene *rrs* (ao redor de 50%), que codifica para o RNA ribossomal 16S, e no gene *rpsL* (ao redor de 20%), que codifica a proteína ribossomal S12 (FINKEN *et al.* 1993). A maioria das mutações pontuais ocorrem no gene *rpsL* e a mutação mais comum é a mudança AAG > AGG no códon 43, que resulta em uma substituição de lisina para arginina, resultando em uma alta resistência à STR (FINKEN *et al.* 1993). A ocorrência de mutação no códon 88 também é comum (NAIR *et al.* 1993). Menos freqüente, é a mudança AAG > ACG, que resulta na troca de lisina para tirosina (MUSSER, 1995). Mutações no gene *rrs* ocorrem nos *loops* do RNAr 16S e são agrupados em duas regiões ao redor dos nucleotídeos 530 e 915 (FINKEN *et al.* 1993; NAIR *et al.* 1993). Para Cooksey *et al.* (1996) cerca de 20 a 30% das bactérias que apresentam baixa resistência (CIM < 32 µg/ml), não possuem mutações nos genes *rpsL* e *rrs*, indicando a presença de outros mecanismos de resistência. Esta resistência pode ser devida à diminuição na concentração citoplasmática de STR pela ação do sistema de efluxo nestas linhagens (ZHANG & TELENTI, 2000; SILVA *et al.* 2001).

1.1.4. Etambutol (ETB)

ETB é outro fármaco de primeira linha usado em combinação com INH, RMP e PZA para prevenir a emergência de isolados resistentes aos fármacos com MICs variando entre 0,5 - 2 µg/ml. EMB é um agente bacteriostático que é ativo para bacilos replicantes e não tem efeito sobre bacilos dormentes. ETB age sobre enzimas envolvidas na biossíntese de arabinogalactano (TAKAYAMA & KILBURN, 1989), inibindo a polimerização de arabinose, de arabinogalactano e de lipoarabinomanano da parede celular (MIKUSOVA *et al.* 1995). Em *M. tuberculosis* o operon *emb* tem três genes contíguos: *embC*, *embA* e *embB*, que codificam arabinosil transferases micobacterianas, compartilhando 65% dos aminoácidos entre si, podendo codificar para proteínas transmembrana (TELENTI, 1997) e são consideradas alvos farmacológicos para ETB.

Mutações para resistência ao EMB ocorrem na frequência de 10^{-5} (TELENTI *et al.* 1997) e as linhagens resistentes apresentam CIM > 7,5 µg/ml (HEIFETS, 2005). Mutações no operon *embCAB*, em especial no gene *embB*, e ocasionalmente no gene *embC* (TELENTI, 1997) e em uma seqüência provavelmente regulatória na região intergênica *embC-embA* (RAMASWAMY *et al.* 2000), são responsáveis pela resistência ao EMB. As substituições no códon 306 no gene *embB* de *M. tuberculosis* têm demonstrado serem as mutações mais frequentes (ao redor de 68%) e preditas para a resistência (SRIVASTAVA *et al.* 2006; RAMASWAMY *et al.* 2000). Porém cerca de 35% dos isolados resistentes com MIC < 10 µg/ml, não possuem mutações no gene *embB*, sugerindo que possam existir outros mecanismos de resistência (ALCAIDE *et al.* 1997).

1.1.5. Pirazinamida (PZA)

PZA apesar de ser utilizada no esquema terapêutico básico, não foi incluída neste estudo pelo fato de não possuir dados de resistência fornecidos pelo Instituto Clemente Ferreira.

1.2. Determinação das mutações gênicas responsáveis pela resistência

1.2.1. PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism)

PCR-SSCP é amplamente usada na detecção de mutações na ciência básica e aplicada e utilizada com sucesso na detecção de mutações em genes associados à resistência a fármacos contra a tuberculose. Sua utilidade é demonstrada na detecção de mutações nos genes *katG*, *inhA* e *oxyR-ahpC*, oferecendo um rastreamento genotípico rápido para mutações associadas à resistência à isoniazida (CARDOSO *et al.* 2004). PCR-SSCP é considerada uma técnica atual não somente para varrer potenciais variações na sequência, mas também para identificar novas mutações. Além disso, sua rapidez e simplicidade para detecção destas mutações a tornam atrativa para o uso em laboratórios de diagnóstico clínico (KAKAVAS *et al.* 2008).

PCR-SSCP envolve a amplificação via PCR de um fragmento alvo, seguida de desnaturação do produto de PCR dupla fita através de aquecimento e formamida (ou outros desnaturantes, por exemplo, hidróxido de sódio e uréia) e eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante (KAKAVAS *et al.* 2008). Na eletroforese, os fragmentos de DNA simples fita adquirem uma conformação tridimensional única, cujas estruturas são estabilizadas por interações intramoleculares (KUSAKABE *et al.* 1993), que são dependentes da sua sequência primária (TELENTI *et al.* 1993). Mesmo uma única base alterada pode resultar em uma mudança conformacional, que pode ser detectada por uma

mobilidade alterada desta molécula de DNA simples fita quando comparada à mobilidade da molécula de DNA simples fita utilizada como controle (KUSAKABE *et al.* 1993). Os fragmentos de DNA podem ser visualizados por autoradiografia dos fragmentos de PCR marcados (KATTAMIS *et al.* 1990), corados com prata (MERRIL *et al.* 1990), brometo de etídeo (XIE *et al.* 1997) ou iniciadores marcados com fluorescência (TAKAHASHI *et al.* 1994).

O número de conformações estáveis, que podem dar origem a bandas de diferentes mobilidades, deve ser determinado experimentalmente sob condições rigorosamente controladas. Parâmetros têm sido empiricamente encontrados afetando a sensibilidade da análise do SSCP (HAYASHI & YANDELL, 1993). Muitas modificações e melhorias foram realizadas para aumentar a diferenciação das mudanças conformacionais e migração do DNA simples fita. As modificações podem ser: o tipo de mutação, o tamanho do fragmento de DNA, o conteúdo de G e C do fragmento, a porcentagem de poliacrilamida, o tamanho do gel e potencial, a temperatura do gel durante a eletroforese, a concentração do DNA, o tempo de corrida da eletroforese, a composição do tampão, incluindo força iônica e pH, assim como aditivos do tampão, como glicerol ou sucrose (KAKAVAS *et al.* 2008).

1.2.2. Sequenciamento de DNA

O seqüenciamento genético é realizado usando seqüenciadores automáticos que são altamente reprodutíveis. Nesta técnica, a região alvo é amplificada via PCR usando iniciadores apropriados e nucleotídeos padrões. O produto de amplificação é desnaturado e submetido à uma nova amplificação, onde os iniciadores 3' e 5' são usados separadamente. Os fragmentos marcados com um fluorocromo específico para o nucleotídeo com o qual termina a cadeia são gerados pela amplificação assimétrica e são colocados por ordem de

tamanho por meio de eletroforese. Os padrões dos marcadores fluorescentes são identificados pelas últimas bases de uma série contínua de elongação, cada série com um nucleotídeo maior do que o anterior, o que possibilita determinar a sequência genética da região. É importante realizar o seqüenciamento das cadeias 3' e 5' para cuidadosamente resolver as discrepâncias (PALOMINO *et al.* 2007).

1.3. Determinação da atividade antimicobacteriana dos fármacos e de novas drogas

1.3.1. REMA (Resazurin Microtiter Assay Plate)

Como um dos métodos analíticos para avaliar a atividade antimicobacteriana dos fármacos, é utilizada a microtécnica denominada de MABA (Microplate Alamar Blue Assay), considerada de fácil execução, pois permite testar vários fármacos e diferentes concentrações em uma única microplaca (COLLINS & FRANZBLAU, 1997). Empregando microplacas de 96 orifícios e utilizando *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 como cepa de referência, a CIM é determinada como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 90% da proliferação bacteriana, utilizando o revelador Alamar Blue, que é substituído pelo reagente resazurina no método REMA (PALOMINO *et al.* 2002). A resazurina é comercializada desde 1993 (O'BRIEN *et al.* 2000), sendo um indicador colorimétrico de óxido-redução (PALOMINO *et al.* 2002) que possui cor azul não-fluorescente no estado oxidado, transformando-se em resorufina, de cor rosa fluorescente, quando está no estado reduzido (NATECHE *et al.* 2006). A fluorescência emitida pela resorufina se deve ao fato de que este composto age como um aceptor de elétrons intermediário no sistema de transporte de elétrons (FAI *et al.* 2009) e exibe forte emissão em comprimentos

de onda maiores que 550 nm. A fluorescência e/ou absorção podem ser lidas como uma medida da viabilidade celular (VIDAL-AROCHA *et al.* 2009), tornando este reagente adequado para avaliação da atividade dos fármacos frente ao *M. tuberculosis*.

1.4. Construção de um painel de isolados clínicos de *M. tuberculosis*

A caracterização dos isolados clínicos quanto ao valor de CIM aos quimioterápicos e as mutações nos genes de resistência permitem a montagem de um painel contendo *M. tuberculosis* com perfil fenotípico e genotípico. A sua utilização para avaliar novas drogas com potencial antimicobacteriano, através da técnica do REMA, se constituiu na primeira etapa para compreender, de forma indireta, mecanismos de ação de complexos promissores como Cu-INH₁, Cu-INH₂ e Cu-RMP, cuja atividade já foi avaliada em *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 (sensível a todas as drogas).

2. OBJETIVOS

Este trabalho objetivou avaliar nos isolados clínicos de *M. tuberculosis*, o perfil de resistência frente aos fármacos do esquema terapêutico, caracterizar as mutações responsáveis por estas resistências e construir um painel com estes isolados clínicos resistentes caracterizados, com a finalidade de testar novas drogas, cuja ação anti-micobacteriana já foi previamente determinada.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Identificação molecular dos isolados clínicos de 106 amostras de *M. tuberculosis* empregando PCR-IS6110 e/ou PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis)

2.1.2. Determinação dos valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de 80 isolados de *M. tuberculosis* frente aos fármacos (INH, RMP, STR e ETB) utilizando o REMA

2.1.3. Comparação do REMA com o BACTEC e determinação da curva ROC

2.1.4. Triagem de mutações associadas com resistência a fármacos utilizando a técnica do PCR-SSCP

2.1.5. Seqüenciamento dos 12 isolados clínicos selecionados para compor o painel

2.1.6. Construção do painel com 12 isolados clínicos resistentes caracterizados quanto ao perfil de resistência a INH e RMP e à presença de mutações responsáveis pela resistência

2.1.7. Determinar o valor da CIM dos compostos Cu-INH₁, Cu-INH₂ e Cu-RMP empregando os 12 isolados clínicos do painel com resistência a INH e/ou RMP

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados clínicos

Os 106 isolados clínicos de *M. tuberculosis* fornecidos pelo Dr. Fernando Augusto Fiúza de Melo foram provenientes de pacientes atendidos no Instituto Clemente Ferreira, localizado na cidade de São Paulo, no período de 2007 a 2009. Estes isolados foram confirmados como de *M. tuberculosis* através da baciloscopia de Ziehl-Nielsen, isolamento em meio LJ e identificação clássica. O perfil de susceptibilidade dos isolados frente aos fármacos do esquema terapêutico foi determinado no mesmo instituto empregando o sistema BACTEC™ MGIT™ 960.

3.2. Identificação molecular de *M. tuberculosis*

3.2.1. Extração do DNA genômico de *M. tuberculosis*

O DNA genômico foi extraído por termólise de acordo com o protocolo de Wade *et al.* (2005) com algumas modificações. Uma alçada do cultivo bacteriano em LJ foi transferida para um criotubo contendo 300 µL de TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) e incubado por 10 minutos em banho de água fervente a 96°C e em seguida armazenado a -20°C por 10 minutos. O procedimento foi repetido mais uma vez, sendo seguido de centrifugação a 16.000 x g (5415C Microcentrifuge, Eppendorf™, Hamburg, Germany) por 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA genômico foi transferido para um tubo novo estéril de 1,5 mL e armazenado a -20°C.

A purificação do DNA (AUSUBEL *et al.* 1989) foi iniciada adicionando-se ao sobrenadante 12 µL de proteinase K e 70 µL de solução SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10%, seguida de um banho de água a 70°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 µL de solução NaCl 5M e 80 µL de solução

CTAB-NaCl (Brometo de Cetil Trimetil Amônio-NaCl) previamente aquecida. Essa mistura foi gentilmente homogeneizada e deixada em banho de água a 70°C por 10 minutos. Então, foram adicionados 700 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e homogeneizados até a obtenção de uma mistura branca leitosa. As amostras foram centrifugadas a 11.750 x g por 5 minutos e a fase superior foi transferida para um tubo novo estéril contendo 450 µL de solução isopropanol. Foi realizada uma homogeneização cuidadosa, e em seguida as amostras foram deixadas a -80°C por 2 horas. Com isso, as amostras foram centrifugadas a 11.750 x g (Avanti™ 30 Centrifuge, Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) por 30 minutos a 4°C, desprezando-se o sobrenadante posteriormente. Após a secagem, foram adicionados 500 µL de solução aquosa de etanol 70% e as amostras foram centrifugadas a 11.750 x g (Avanti™ 30 Centrifuge, Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado novamente e os tubos foram secados completamente a temperatura ambiente. As amostras foram então ressuspensas em 50 µL de solução TE (pH 8,0) e solubilizadas em banho de água a 70°C por 1 hora. Depois, foram armazenadas a -20°C por 2 horas, até o momento do uso.

3.2.2. Quantificação do DNA genômico de *M. tuberculosis*

A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria a 260 nm e 280 nm e a sua pureza foi determinada pela relação A260/A280 (Sambrook & Russel, 2001), no espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA), utilizando 2 µL da amostra de DNA.

3.2.3. Identificação molecular de *M. tuberculosis* utilizando a PCR- IS6110

A identificação molecular dos isolados clínicos para confirmação de *M. tuberculosis* foi realizada com a amplificação de um dos elementos

transponíveis (van EMBDEN *et al.* 1993), o transposon IS6110 (THIERRY *et al.* 1990). Este transposon está presente em um número de cópias variável (de 0 a 25 cópias) e em diferentes locais de inserção no cromossomo de diferentes linhagens do complexo *M. tuberculosis* (VIANA-NIERO *et al.* 2006). Os iniciadores utilizados para a identificação foram:

INS-1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3')

INS-2 (5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3')

Para a amplificação do fragmento com tamanho de 245 pb gerado pela PCR, utilizou-se o seguinte procedimento na reação: 21,5 µL de mistura reativa de PCR (FermentasTM, Glen Burnie, MD, USA), acrescidos de 0,25 µL de cada iniciador (20 µM) (INS-1 e INS-2) e 1 µL do DNA genômico (100 ηg/µL). Após o preparo, a reação foi submetida à ciclagem no termociclador PTC-100 (MJ ResearchTM Inc., Watertown, MA, USA) nas seguintes condições: primeira etapa (94°C por 10 minutos), segunda etapa (30 ciclos iguais de 94°C por 1 minuto, 56°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto) e terceira etapa (72°C por 10 minutos). Na seqüência, 10 µL do produto amplificado foi aplicado no gel de agarose 1%, juntamente com um padrão de peso molecular de 100 pb (FermentasTM, Glen Burnie, MD, USA) e corado com brometo de etídio. O gel foi fotodocumentado no transiluminador AlphaImagerTM (Cell Biosciences, formerly AlphaInnotech, Santa Clara, CA, USA). As amostras que apresentaram produto de amplificação com tamanho de 245 pb foram caracterizadas como de *M. tuberculosis* e nestas amostras foi determinada a CIM para INH, RMP, STR e ETB.

3.2.4. Identificação molecular de *M. tuberculosis* utilizando a técnica da PCR-Restriction Enzyme Analysis (PRA)

As amostras não amplificadas para IS6110 foram submetidas ao PRA (TELENTI *et al.* 1993). Esta técnica consiste na amplificação do gene *hsp65*, cujo produto possui tamanho de 439 pb, sendo submetido à ação de duas enzimas de restrição (*BstEII* e *HaeIII*) e posterior análise dos fragmentos da digestão para a identificação da espécie de micobactéria (TELENTI *et al.* 1993). Foram empregados os seguintes oligonucleotídeos:

Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3')

Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT-3')

Na reação utilizou-se o seguinte procedimento: 23 µL de mistura reativa de PCR (FermentasTM, Glen Burnie, MD, USA), acrescidos de 0,25 µL de cada iniciador (20 µM) (Tb11 e Tb12) e 1 µL do DNA genômico (100 ng/ µL). Após o preparo, a reação foi submetida à ciclagem no Termociclador PTC-100 (MJ ResearchTM Inc., Watertown, MA, USA) nas seguintes condições: primeira etapa (94°C por 10 minutos), segunda etapa (45 ciclos iguais de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e terceira etapa (72°C por 10 minutos). Na seqüência, 3 µL do produto amplificado foram aplicados no gel de agarose a 1%, juntamente com um padrão de peso molecular de 100 pb (FermentasTM, Glen Burnie, MD, USA) e corados com brometo de etídio para a visualização do produto de amplificação no tamanho de 439 pb do gene *hsp65*.

Os fragmentos no tamanho de 439 pb foram então tratados com as enzimas de restrição *BstEII* (FermentasTM, Glen Burnie, MD, USA) e *HaeIII* (FermentasTM, Glen Burnie, MD, USA) em tubos separados. Para a digestão, 10 µL do produto amplificado foi adicionado ao mix contendo 0,5 µL de enzima *BstEII* (~5 unidades), 2,5 µL de tampão e 11,5 µL de água milli-Q, sendo

posteriormente incubado a 60°C por 60 minutos. Similarmente, 10 µL do produto amplificado foi adicionado ao mix contendo 0,5 µL de enzima *HaeIII* (~5 unidades), 2,5 µL de tampão e 11,5 µL de água milli-Q, sendo posteriormente incubado a 37°C por 60 minutos. Na seqüência, 10 µL do produto amplificado foram aplicados no gel de agarose a 4%, juntamente com um padrão de peso molecular de 50 pb (FermentasTM, Glen Burnie, MD, USA) e de 25 pb (FermentasTM, Glen Burnie, MD, USA) e corado com brometo de etídio. A determinação da espécie foi realizada utilizando o software AlphaEase FC Stand AloneTM (Cell Biosciences, formerly AlphaInnotech, Santa Clara, CA, USA), que possui um algoritmo que tem por base os tamanhos moleculares dos fragmentos gerados pela PCR.

3.3. Determinação dos valores de CIM nos isolados clínicos de *M. tuberculosis* frente aos fármacos INH, RMP, STR e ETB

3.3.1. Fármacos utilizados no estudo e suas diluições

Os fármacos utilizados no estudo foram: INH, RMP, STR e ETB (Sigma-AldrichTM, Steinheim, Germany). Inicialmente, os fármacos foram preparados em solução estoque de 10 µg/mL e conservados em -80°C até o momento do uso. Foram realizadas diluições seriadas das soluções dos fármacos em meio Middlebrook 7H9 (DifcoTM, Detroit, MI, USA) em uma microplaca de 96 orifícios, de maneira a se obter concentrações variadas em µg/mL (Tabela 1a). Uma diluição posterior na microplaca de 96 orifícios foi realizada para os fármacos INH e RMP, com o intuito de se obter valores de CIM maiores do que os anteriores (Tabela 1b), uma vez que o maior valor de CIM para INH e RMP era de 1 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente.

Tabela 1. Diluição dos fármacos utilizados no estudo. a) Diluição inicial das soluções no meio de cultura Middlebrook 7H9 de maneira a obter concentrações variáveis ($\mu\text{g/mL}$) dos fármacos. b) Diluição posterior das soluções no meio de cultura Middlebrook 7H9 de maneira a se obter concentrações variáveis maiores ($\mu\text{g/mL}$) somente dos fármacos INH e RMP

INH	RMP	STR	ETB
1	2	4	64
0,500	1	2	32
0,250	0,500	1	16
0,120	0,250	0,500	8
0,060	0,125	0,250	4
0,030	0,062	0,125	2
0,015	0,030	0,062	1
0,007	0,015	0,031	0,500

(a)

INH	RMP
25	25
12,5	12,5
6,250	6,250
3,125	3,125
1,562	1,562
0,781	0,781
0,390	0,390
0,195	0,195

(b)

3.3.2. Preparo das suspensões bacterianas dos 80 isolados clínicos de *M. tuberculosis* e da cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv

A cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 foi utilizada no estudo para a determinação da CIM no REMA e na PCR-SSCP para a determinação das mutações responsáveis pela resistência. Suspensões bacterianas foram

preparadas a partir de uma alçada plena da cultura de isolados clínicos em LJ (Lowenstein-Jensen) e também da cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294. Cada alçada de bactérias foi colocada juntamente com pérolas de vidro em meio de cultura Middlebrook 7H9 (Difco™ Laboratories, Detroit, MI, USA) contidas em tubos de vidro. As suspensões bacterianas foram agitadas no vórtex para homogeneização e uma alíquota foi retirada para ajuste da escala 1 de McFarland (1×10^7 UFC/mL). Após o ajuste, as suspensões foram diluídas na proporção 1:25 em meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) para obtenção da concentração bacilar de 1×10^5 UFC/mL (unidade formadora de colônia/mL).

3.3.3. Determinação do valor de CIM frente aos fármacos dos 80 isolados de *M. tuberculosis* utilizando a técnica do REMA

O valor de CIM aos fármacos (INH, RMP, STR e ETB) dos 80 isolados clínicos de *M. tuberculosis* e à cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294, foi determinada segundo Collins & Franzblau *et al.* (1998). Nas colunas 1 e 12 de uma microplaca de 96 orifícios foram depositados 200 µL de água destilada, para evitar a desidratação do meio de cultura no ensaio durante a incubação na estufa (Figura 1). Nas demais colunas da microplaca, uma diluição seriada dos fármacos foi realizada conforme citado no subitem 3.3.1. O primeiro orifício da microplaca contendo cada fármaco a ser analisado foi utilizado para controle de contaminação, onde foram adicionados apenas o meio de cultura e o fármaco, onde é esperado não haver crescimento bacteriano.

Volume de 100 µL da diluição de 1×10^5 UFC/mL foi inoculado em cada um dos orifícios contendo as soluções dos fármacos nas concentrações estabelecidas. A microplaca foi selada com parafilme e incubada a 37°C. Após seis dias de incubação foi adicionado no orifício de controle de cepa

micobacteriana e no orifício de controle de meio, volume de 30 μL da resazurina 0,01% (Sigma-AldrichTM, Steinheim, Germany) diluída em água estéril. A microplaca foi reincubada a 37°C por 24 horas, e em seguida foi realizada a leitura. Obtendo-se o desenvolvimento de cor rósea no orifício controle de cepa micobacteriana, foram adicionados 30 μL da solução de resazurina nos demais orifícios, sendo as microplacas reincubadas a 37°C por mais 24 horas. Quando não houve mudança para a cor rósea, a placa foi incubada por mais 24 horas. Após este período, foi realizada a leitura final, baseada na interpretação da fluorescência no leitor de microplacas SpectraFluor PlusTM (TECAN, San Jose, CA, USA), onde utilizou-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm, respectivamente.

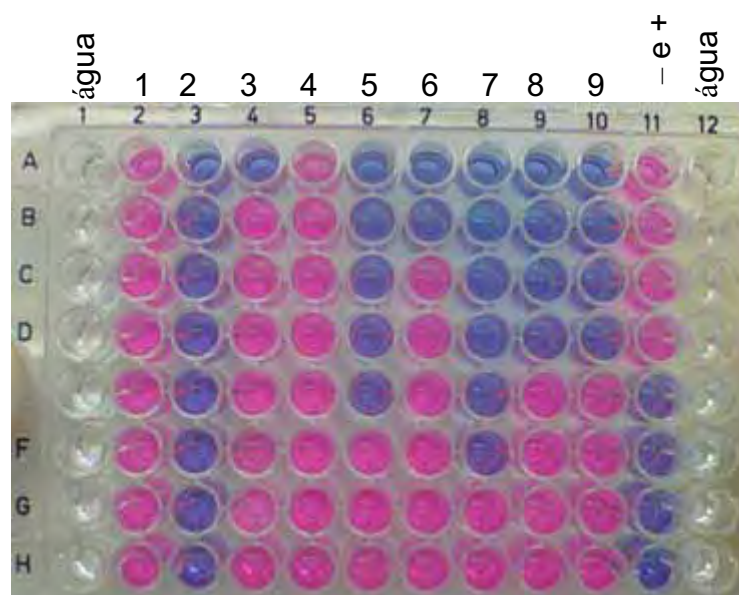


Figura 1. Microplaca de 96 orifícios utilizada na técnica do REMA. A determinação do perfil de susceptibilidade e dos valores de CIM foram obtidos pelo REMA. Nas colunas 1 e 12 foi adicionada água para evitar ressecamento da microplaca e na coluna 11 foram adicionados o controle positivo com a cepa padrão H₃₇Rv e o controle negativo. Nos demais orifícios, os quatro fármacos foram diluídos de forma seriada, possibilitando a utilização de 2 isolados clínicos de *M. tuberculosis* por microplaca.

Na realização do REMA (PALOMINO *et al.* 2002), determinou-se a CIM do agente antimicrobiano capaz de inibir 90% da população bacteriana *in vitro* (COLLINS & FRANZBLAU, 1997; FRANZBLAU *et al.* 1998), ou seja, a menor concentração das drogas capaz de impedir a mudança de cor azul (resazurina) para rosa (resorufina), devido aos metabólitos produzidos pelos micro-organismos.

3.3.4. Análise estatística e determinação da curva ROC e valor do ponto de corte

Considerando os resultados do perfil de susceptibilidade dos 80 isolados de *M. tuberculosis*, obtidos previamente pelo Instituto Clemente Ferreira, utilizando o sistema automatizado BACTEC™ MGIT™ 960 como padrão ouro, os valores de CIM obtidos no REMA para cada isolado e fármaco analisado, foram determinados os valores da curva ROC e dos valores de ponto de corte. A análise estatística foi realizada com auxílio do software MedCalc (MedCalc™ Statistical Software, Mariakerke, Bélgica) para análise da curva ROC e ponto de corte para cada um dos fármacos utilizados no estudo. Na análise da curva ROC, quanto mais próximo a curva segue próxima ao eixo Y até o topo, mais exato é o teste, quanto mais afastado do eixo Y, menos exato é o teste. Uma área de 1 representa que o teste é perfeitamente reprodutível, por outro lado, uma área de 0,5 representa que o teste não é reprodutível (LUNA-HERRERA *et al.* 2003).

3.3.5. Sensibilidade, especificidade e acurácia do REMA

Uma vez determinados os valores do ponto de corte para cada fármaco pelo REMA, os 80 isolados clínicos de *M. tuberculosis* foram classificados como sensíveis (quando o valor de CIM era menor ou igual ao valor do ponto de corte) e resistentes (quando o valor de CIM era maior que o valor do ponto de corte) para cada um dos fármacos. Posteriormente, estes resultados de CIM

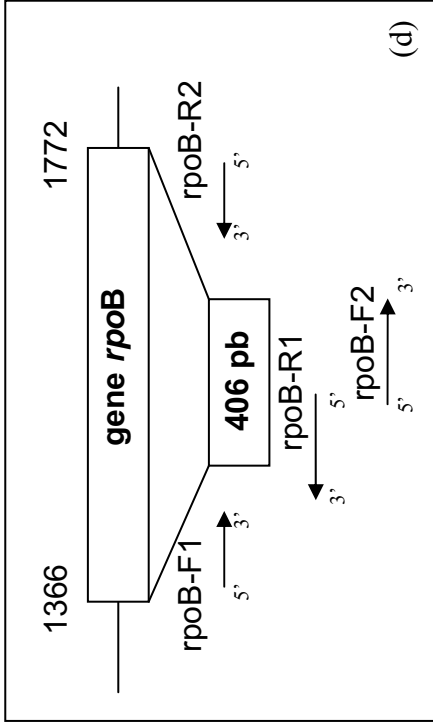
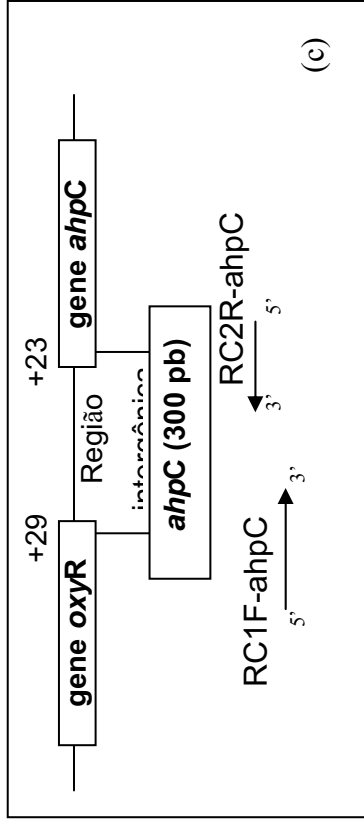
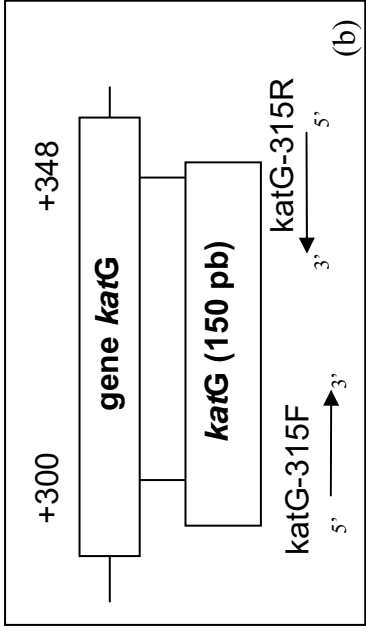
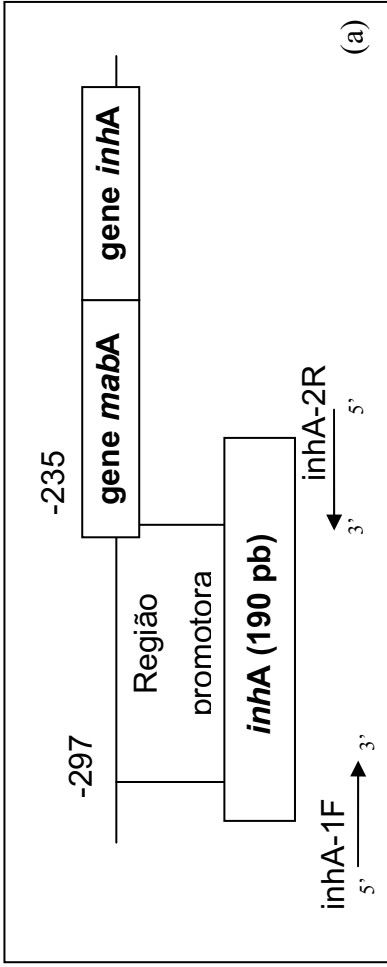
foram avaliados comparativamente aos resultados do BACTEC™ MGIT™ 960, determinando a sensibilidade, especificidade e acurácia do REMA.

A sensibilidade do REMA foi determinada pela capacidade do teste em identificar corretamente os valores verdadeiramente positivos (no caso, isolados resistentes), entre aqueles que a possuem, ou seja, o quão sensível foi o teste. A especificidade foi determinada pela capacidade da técnica em excluir corretamente aqueles verdadeiramente negativos (no caso, isolados sensíveis), ou seja, o quão específico o teste foi. Entende-se por acurácia, a capacidade quantitativa do novo teste, no caso o REMA, em discriminar o grupo testado (em isolados positivos e negativos), quando comparado a um método padrão já validado (LUNA-HERRERA *et al.* 2003). Os seguintes parâmetros foram usados para avaliar a acurácia do REMA, baseados na área sob a curva (ASC): 1 a 0,9 = excelente; 0,9 a 0,8 = bom; 0,8 a 0,7 = razoável; 0,7 a 0,6 = fraco e 0,6 a 0,5 = falho (LUNA-HERRERA *et al.* 2003).

3.4. Triagem das mutações associadas à resistência aos fármacos utilizando PCR-SSCP

A triagem para detecção das mutações foi realizada pela PCR-SSCP (TELENTI *et al.* 1993). Nesta técnica, os isolados de *M. tuberculosis* que apresentarem padrões de SSCP diferentes em relação ao padrão de SSCP apresentado pela cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv foram definidos como portadores de mutações nos genes de resistência aos fármacos. Para a amplificação, foram escolhidas determinadas sequências dentro de cada gene ou na sua região promotora. Os genes escolhidos foram: *inhA* (CARDOSO *et al.* 2004) (Figura 2a), *katG* (CARDOSO *et al.* 2004) (Figura 2b) e *ahpC* (CARDOSO *et al.* 2004) (Figura 2c); *rpoβ* (LIPIN *et al.* 2007) (Figura 2d); *rpsL* (LIPIN *et al.* 2007) (Figura 2e) e *rrs* (LIPIN *et al.* 2007) (Figura 2f) e *embB*

(AHMAD *et al.* 2007) (Figura 2G). Para os genes *rpsL*, *rrs* e *rpoβ*, foram utilizados dois pares de iniciadores para a obtenção de produtos de amplificação de até 300 pb de tamanho, de acordo com a recomendação do fabricante (GE Healthcare). O desenho dos iniciadores internos a estes genes foi feito utilizando o software Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Os iniciadores utilizados para a amplificação de cada gene estão ilustrados na seguinte Tabela 2.



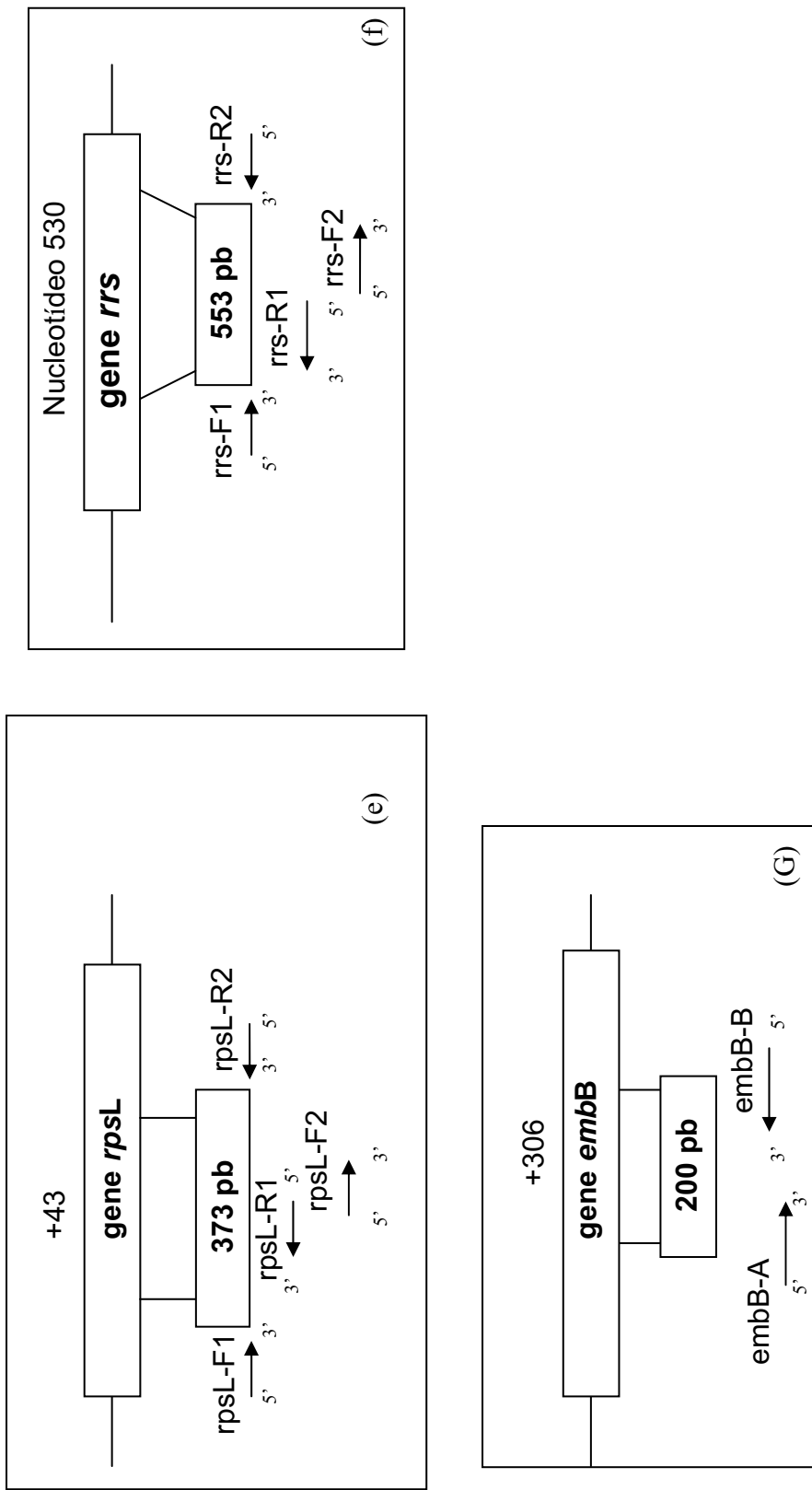


Figura 2. Esquema ilustrando as regiões selecionadas, com os respectivos iniciadores, para a triagem das mutações dentro de cada gene. (a) região promotora do gene *infaA*; (b) região promotora do gene *katG*; (c) região promotora do gene *ahpC*; (d) região promotora do gene *rpoβ*; (e) região promotora do gene *rpsL*; (f) região promotora do gene *rrs*; (G) região promotora do gene *embB*.

Tabela 2. Iniciadores utilizados na PCR-SSCP. Cada gene é ilustrado com a sua respectiva identificação, número de laboratório, sequência de nucleotídeos, temperatura de hibridização e tamanho do produto amplificado

gene	nº lab	sequência	temp. de hibridização	tamanho do fragmento
<i>inhA</i>	63	5'-GCTGAGTCACACCGACAAACG-3'	58°C	190 pb
	64	5'-CCAGGACTGAACGGGATACGA-3'	58°C	
<i>kafG</i>	61	5'-AGAGCTCGTATGGCACCCGGA-3'	58°C	150 pb
	62	5'-CCAGCAGGGCTCTTCGTTCAG-3'	58°C	
<i>ahpC</i>	65	5'-CTTGCCGCACTGCTGAACCAC-3'	60°C	300 pb
	66	5'-ACAGGTCACCGCCGATGAGAG-3'	60°C	
<i>rpoβ</i>	75	5'-GTCGGCGAGCTGATCCAAAAC-3'	62°C	209 pb
	78	5'-GACAGTCGGCGCTTGTGG-3'	58°C	
<i>rpoβ</i>	77	5'-ACAAGCGCCGACTGTCGG-3'	62°C	197 pb
	76	5'-GGTACGGCGTTTCGATGAACC-3'	58°C	

71	5'-CCAGCAGCTGGTCCGCAAGG-3'	58°C	181 pb
80	5'-CCGTGACCTCGACCTGACTCGTC-3'	58°C	
<i>rpsL</i>			
79	5'-TTGACGAGTCAGGTCGAGGTC-3'	58°C	175 pb
72	5'-TGC GTGGCATCAGCCCTTCTC-3'	58°C	
<i>rps</i>			
73	5'-TAAACCTCTTTCACCATCGACGA-3'	58°C	292 pb
82	5'-TTCGCCACCGGTGTTCCCTC-3'	58°C	
81	5'-AGATATCAGGAGGAACACCCGGTG-3'	58°C	246 pb
74	5'-CCAGGTAAGGTTCTTCGCCGTTG-3'	58°C	
<i>embB</i>			
69	5'-CCGACGCCGTGGTGATATTCGGCT-3'	60°C	200 pb
70	5'-GTAATACCAGCCGGAAGGGATCCTC-3'	60°C	

Após a amplificação destes genes pela PCR, os produtos amplificados foram desnaturados a 94°C por 8 minutos em solução de formamida 95%, EDTA 20 mM, xilenocianol 0,005% e azul de bromofenol 0,005% e posteriormente colocados em gelo. A seguir, 5 µL dos produtos desnaturados foram aplicados no gel de poliacrilamida GeneGel Excel 12.5/24 (GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) para separação eletroforética utilizando o sistema GenePhor™ (GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). As condições eletroforéticas (600V, 5-15°C, 1-1,5 h) foram otimizadas no laboratório para cada um dos genes (Tabela 3).

Tabela 3. Condições eletroforéticas utilizadas na PCR-SSCP. Cada par de iniciadores é ilustrado com a sua respectiva identificação, voltagem, temperatura e tempo de corrida

Iniciadores	Voltagem	Temperatura	Tempo
<i>inhA</i> -1F <i>inhA</i> -2R	600V	5°C	1,5 h
<i>katG</i> -315F <i>katG</i> -315R	600V	5°C	1 h
RC1F RC2R	600V	5°C	1,5 h
<i>rpsL</i> -F1 <i>rpsL</i> -R1 <i>rpsL</i> -F2 <i>rpsL</i> -R2	600V	15°C	1,5 h
<i>rrs</i> -F1 <i>rrs</i> -R1 <i>rrs</i> -F2 <i>rrs</i> -R2	600V	10°C	1 h
<i>embB</i> -A <i>embB</i> -B	600V	5°C	1,5 h

Após a separação eletroforética, os géis foram corados inicialmente com solução ácido acético 0,5% e solução etanol 10% por 20 min sob agitação. Em seguida foram impregnados com solução de prata 0,17% durante 20 min sob agitação. Os géis foram lavados com água destilada para retirar o excesso de prata. O DNA foi então precipitado com formaldeído 37% em solução de NaOH 3% durante 20 minutos sob agitação, para a visualização dos perfis eletroforéticos de SSCP. Baseado nos dados de CIM e das mutações detectadas no SSCP, 12 isolados de *M. tuberculosis* foram selecionados para o seqüenciamento das regiões do SSCP, com o intuito de identificar se essa alteração no SSCP estava relacionada a uma mudança no códon associado à resistência aos fármacos, e em que local do gene ou do promotor do gene esta mudança está localizada.

3.5. Sequenciamento dos genes dos isolados clínicos selecionados

O seqüenciamento dos genes dos isolados clínicos pertencentes ao painel, consistiu na amplificação dos genes *inhA*, *katG*, *ahpC*, *rpoβ*, *rpsL*, *rrs* e *embB*, com os mesmos iniciadores utilizados no SSCP (Tabela 2). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação. Os produtos da PCR foram purificados utilizando as enzimas ExoSAP-IT (USB, Cleveland, USA), com uma incubação de 15 min a 37°C para a ação enzimática, seguido de uma incubação de 15 min a 80°C para a inativação enzimática. Em seguida, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Os produtos purificados foram ajustados para a concentração de 20 ng/μL, juntamente com os iniciadores, que foram ajustados para a concentração de 5 μM.

O seqüenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo, utilizando o sistema de seqüenciamento de DNA MEGABACE™ 1000 de 96 amostras (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brasil). As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* que contém a *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase* (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brasil) seguindo as instruções do fabricante.

Para cada reação, foram utilizados 5 uL do produto de PCR purificado e 2,5 uL de cada iniciador por reação para o seqüenciamento das fitas sense e antisense. Os resultados do seqüenciamento foram analisados pelo software Sequencher™, versão 4.10.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA), que comparou as seqüências obtidas dos isolados clínicos com a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv. O software Gene Runner (Hastings Software, Colorado, USA) foi utilizado para a determinação da posição da mutação no gene ou no promotor do gene e o códon correspondente à mudança.

3.6. Escolha dos isolados clínicos para avaliação dos compostos Cu-INH₁, Cu-INH₂ e Cu-RMP

Para o ensaio dos compostos, foi montado um painel contendo 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis* com resistência a INH e/ou RMP, com valores de CIM, presença ou ausência de mutação através do SSCP e resultados de seqüenciamento dos genes estudados. Os 12 isolados clínicos do painel foram testados frente os compostos Cu-INH₁ (cobre-isoniazida com enxofre), Cu-INH₂ (cobre-isoniazida com oxigênio) e Cu-RMP (cobre-rifampicina) empregando a técnica do REMA como descrito no item 3.3.3. A ação anti-micobacteriana destes compostos contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 já havia sido comprovada previamente, com resultados promissores. Estes compostos foram

sintetizados no Laboratório de Química Inorgânica do Instituto de Química da UNESP Araraquara, pela doutoranda Patrícia Bento da Silva sob orientação da Profa. Dra. Regina Célia Galvão Frem Di Nardo.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação molecular dos isolados clínicos de *M. tuberculosis*

A identificação pela técnica da PCR- IS6110 dos isolados clínicos através da amplificação do transposon IS6110 foi realizada em 106 isolados. Em 100 isolados (94,3%) foi verificado o produto amplificado no tamanho de 245 pb (Figura 3), sendo identificados como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. Os 6 isolados que não apresentaram amplificação, foram submetidos ao PRA.

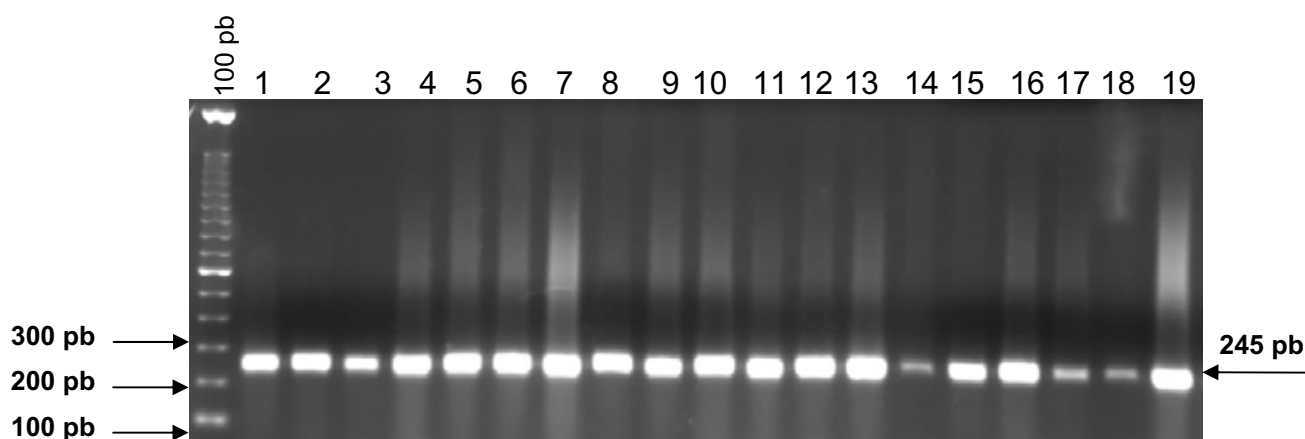


Figura 3. Resultado da identificação molecular. São apresentados os fragmentos gerados pela amplificação do transposon IS6110 no tamanho de 245 pb

No PRA, a amplificação do gene *hsp65* de cada isolado resultou em produtos no tamanho de 430 pb (Figura 4), que foram submetidos à digestão pela enzima *Bst*EII (Figura 5) gerando os fragmentos (de 230/210/115/85 pb para as amostras 1, 2, 3, 4 e 5; e de 230/210 pb para a amostra 6) e pela enzima *Hae*III (Figura 5) gerando os fragmentos (de 150/125/100/75/66 para as

amostras 1, 2, 3 e 5; e de 145/125/70 para a amostra 4; e de 125/100/75 para a amostra 6).

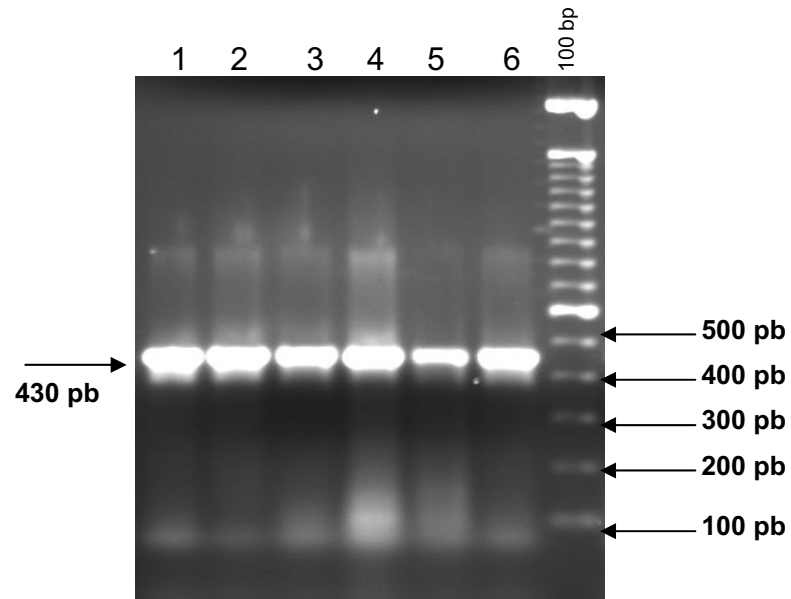


Figura 4. Resultado da amplificação do gene *hsp65*. São apresentados os fragmentos amplificados pela PCR dos 6 isolados clínicos no tamanho de 430 pb

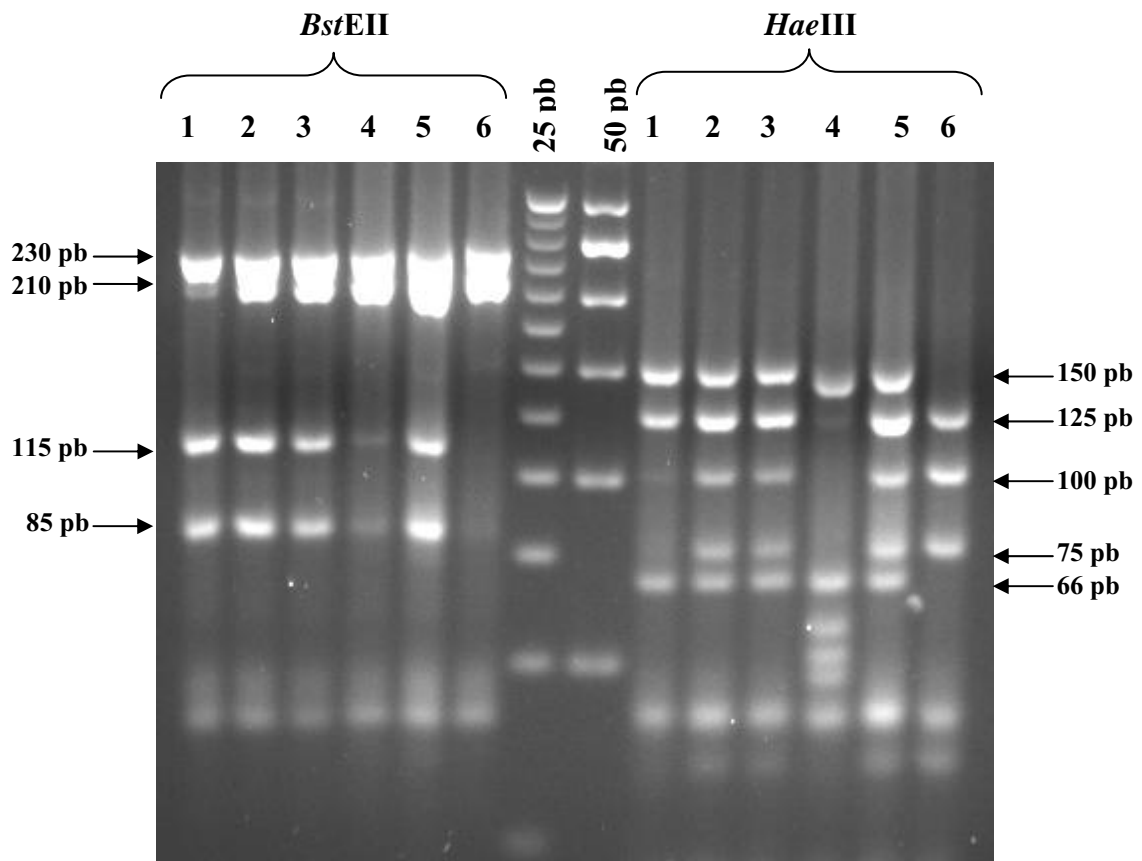


Figura 5. Resultado da identificação utilizando o PRA. São apresentados os fragmentos resultantes da ação das enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*, com os respectivos tamanhos em pb

Com o auxílio do PRASITE, foi possível a identificação apenas do isolado 6, como sendo pertencente à espécie *M. parascrofulaceum*. Nos demais isolados (1, 2, 3, 4 e 5), a identificação apresentou resultado inconclusivo, pois o número analisado de fragmentos excedia o número esperado de fragmentos. Para a identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, após a digestão, eram esperados os fragmentos de 230 pb, 115 pb e 85 pb para a enzima *BstEII* e fragmentos de 150 pb, 125 pb e 75 pb para a enzima *HaeIII*. Além destes fragmentos, foram encontrados fragmentos de 210 pb (*BstEII*), 100 pb e 66 pb (*HaeIII*). Analisando estes fragmentos não pertencentes ao complexo *M.*

tuberculosis, a identificação mais provável teve como resultado a espécie *M. abscessus*.

4.2. Determinação dos valores de CIM dos fármacos testados nos isolados de *M. tuberculosis*

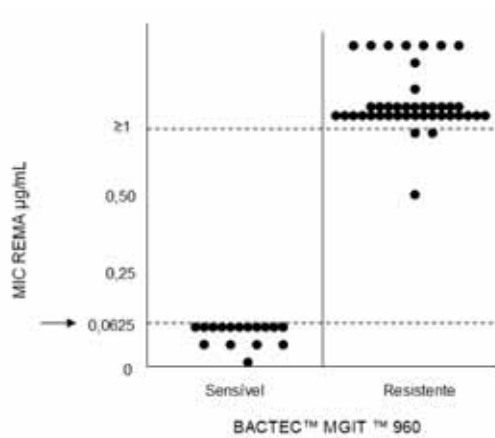
Os fármacos INH, RMP, STR e ETB, foram testados em 80 do total de 100 isolados clínicos de *M. tuberculosis* pelo REMA, devido a problemas de contaminação e ressecamento do meio de cultura.

4.2.1. Determinação da curva ROC, do valor do ponto de corte e da sensibilidade e especificidade da técnica do REMA

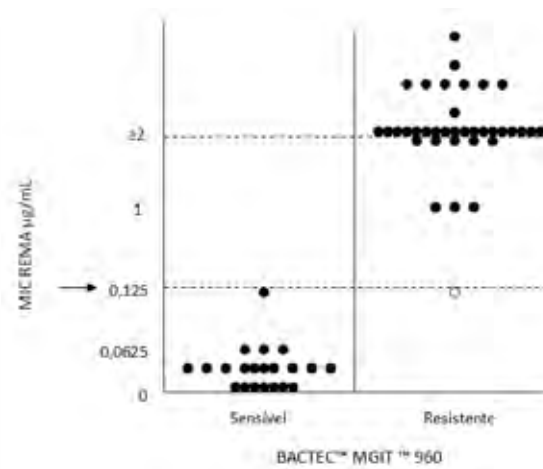
Para a determinação destes parâmetros foram utilizados apenas 57 isolados clínicos, restando 23 isolados cujos dados de resistência pelo sistema BACTEC™ MGIT™ 960 não foram fornecidos. O REMA foi validado através dos resultados fornecidos pelo BACTEC™ MGIT™ 960, que foi estabelecido como padrão ouro (LUNA-HERRERA *et al.* 2003).

A determinação do ponto de corte para cada fármaco foi baseada na interpretação da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) (ZEIG, 1993) utilizando o software MedCalc (Mariakerke, Bélgica), que forneceu o ponto de corte correspondente e avaliou a performance do teste, utilizando os critérios de sensibilidade e especificidade e o cálculo da área sob a curva. Baseado nos valores de ponto de corte para cada fármaco (Figuras 6a, 6b, 6c e 6d), os isolados clínicos de *M. tuberculosis* foram classificados em sensíveis (valores de CIM inferior ou igual ao ponto de corte) e resistentes (valor de CIM superior ao ponto de corte) pelo REMA. Para a INH, o ponto de corte obtido foi de 0,0625 µg/mL, para a RMP foi de 0,125 µg/mL, para a STR foi de 0,25 µg/mL e para o ETB foi de 8,0 µg/mL (Tabela 4).

Dentre os isolados classificados como resistentes, uma subclassificação foi realizada dividindo-os em isolados de baixa e de alta resistência (Figuras 6a, 6b, 6c e 6d), com valores do ponto de corte para INH, RMP, STR e ETB, de $\geq 1 \mu\text{g/mL}$, $\geq 2 \mu\text{g/mL}$, $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 16 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Como resultados desta subclassificação, para INH, foram considerados 53 (84,1%) isolados de alta resistência e 10 (15,8%) isolados de baixa resistência; para RMP, foram considerados 30 (73,1%) isolados de alta resistência e 11 (26,8%) isolados de baixa resistência; para STR, foram considerados 19 (44,1%) isolados de alta resistência e 24 (55,8%) isolados de baixa resistência; para ETB, foram considerados 40 (85,1%) isolados de alta resistência e 7 (14,8%) isolados de baixa resistência.



(a)



(b)

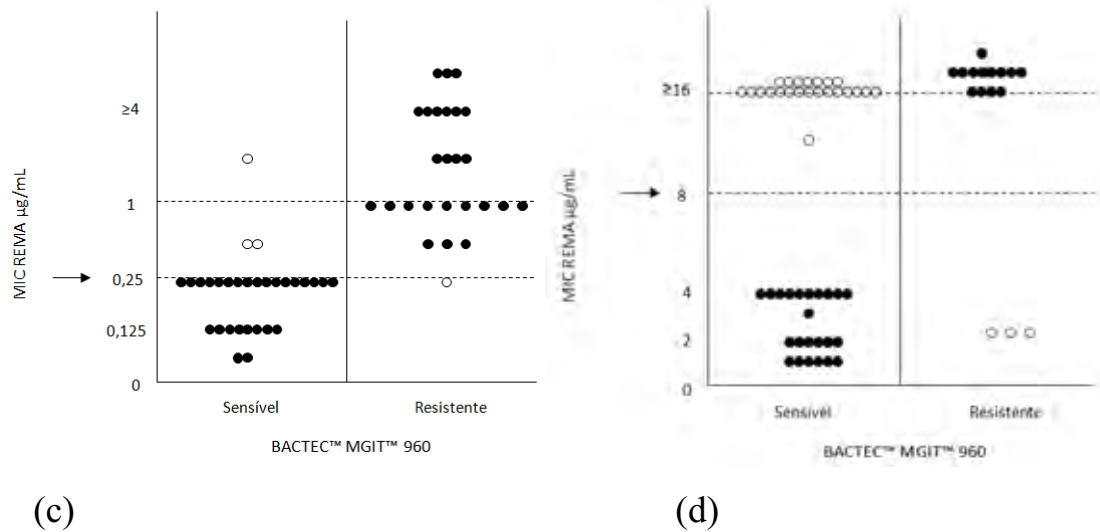


Figura 6. Comparação entre BACTEC™ MGIT™ 960 e REMA. Para cada fármaco, são ilustradas amostras concordantes (●) e amostras discordantes (○) e a subclassificação realizada. (a) Correlação para INH. (b) Correlação para RMP. (c) Correlação para STR. (d) Correlação para ETB

Na comparação do REMA com os dados obtidos pelo BACTEC™ MGIT™ 960, as amostras apresentaram resultados concordantes (●) e discordantes (○) (Figuras 6a, 6b, 6c e 6d e Tabela 4). Para INH não houveram resultados discordantes entre as metodologias. Para RMP, foi observado 1 falso sensível pelo REMA, Para STR, foi observado 1 falso sensível e 3 falso resistentes pelo REMA. Para ETB, foram observados 3 falso sensíveis e 23 falso resistentes pelo REMA.

Tabela 4. Teste de sensibilidade de 57 isolados clínicos sensíveis, mono e MDR-TB comparando o método BACTEC™ MGIT™ 960 com o REMA

REMA	BACTEC™ MGIT™ 960							
	INH		RMP		STR		ETB	
	R	S	R	S	R	S	R	S
R	41	0	35	0	26	3	13	23
S	0	16	1	21	1	27	3	18
Total	41	16	36	21	27	30	16	41
<i>Ponto de corte</i>	> 0,0625		> 0,125		> 0,25		> 8,0	

4.2.2. Sensibilidade e especificidade do REMA frente aos fármacos e cálculo da área sob a curva

A comparação do desempenho entre BACTEC™ MGIT™ 960 e REMA foi avaliada utilizando os critérios de sensibilidade e especificidade, juntamente com o cálculo da área sob a curva (ASC) fornecidos pelo software MedCalc dos fármacos INH, RMP, STR e ETB e apresentado nas Figuras 7, 8, 9 e 10, respectivamente.

A Figura 7 apresenta os parâmetros observados para INH, onde foram encontrados valores de sensibilidade e de especificidade de 100%, ASC de 1,0 e ponto de corte $> 0,0625 \mu\text{g/mL}$. No caso da INH, como não houve nenhuma amostra discordante entre as técnicas avaliadas, tanto para isolados resistentes como para isolados sensíveis, foram observados os valores de 100% para sensibilidade e especificidade (Tabela 4 e Figura 6a).

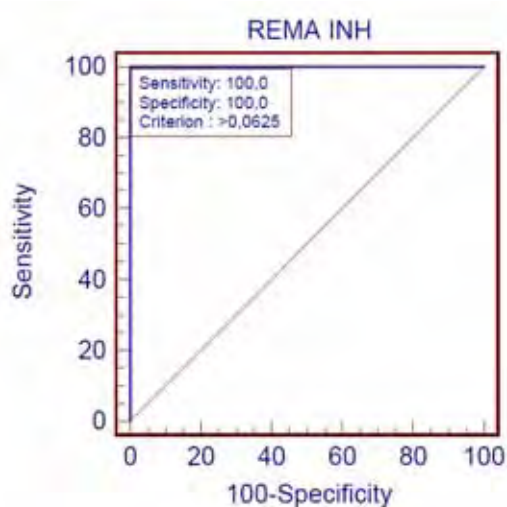


Figura 7 - Curva ROC da INH determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e ponto de corte

A Figura 8 apresenta os parâmetros observados para RMP, onde foram encontrados valores de sensibilidade de 97,2% e de especificidade de 100%, ASC de 0,997 e ponto de corte $> 0,125 \mu\text{g/mL}$. Para a RMP, foi encontrada apenas uma amostra discordante, com um falso sensível (Tabela 4 e Figura 6b). Essa discordância foi a responsável pela diminuição do valor de sensibilidade entre as técnicas quando comparada à INH, mas por outro lado, os verdadeiros sensíveis apresentaram 100% de coerência entre as duas técnicas, resultando em um valor de especificidade de 100%.

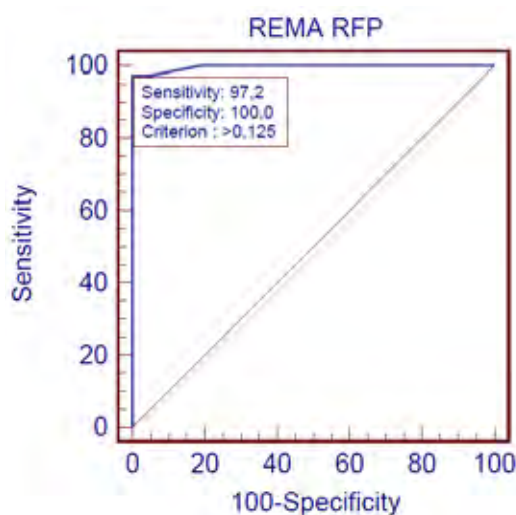


Figura 8 - Curva ROC da RMP determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e ponto de corte

A Figura 9 apresenta os parâmetros observados para STR, onde foram encontrados valores de sensibilidade de 92,6% e de especificidade de 90%, ASC de 0,951 e ponto de corte $> 0,25 \mu\text{g/mL}$. Para a STR foram encontradas 4 amostras discordantes, com um 1 falso sensíveis e 3 falsos resistentes entre as técnicas avaliadas, gerando valores menores de sensibilidade e especificidade, respectivamente, quando comparados aos fármacos INH e RMP (Tabela 4 e Figura 6c).

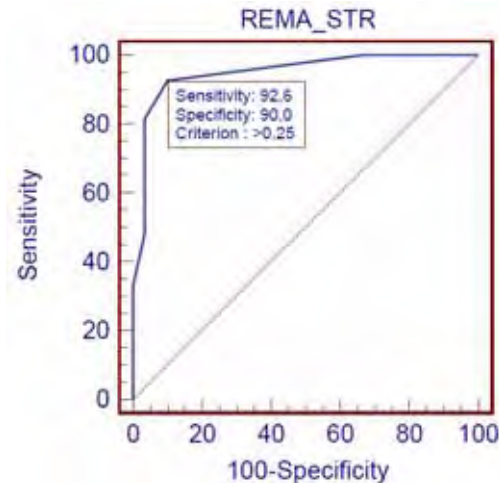


Figura 9 - Curva ROC da STR determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e ponto de corte

A Figura 10 apresenta os parâmetros observados para o ETB, onde foram encontrados valores de sensibilidade de 89,5% e 56,4% de especificidade, ASC de 0,734 e ponto de corte $> 8 \mu\text{g/mL}$. Para o ETB, foram encontrados 26 isolados discordantes, com 3 falsos sensíveis e 23 falsos resistentes entre as técnicas avaliadas. O índice de sensibilidade com resultado próximo a 90% é comparável a de outros fármacos, porém o índice de especificidade foi muito baixo devido à presença de muitos isolados com resultados falsamente resistentes para o REMA (Tabela 4 e Figura 6d).

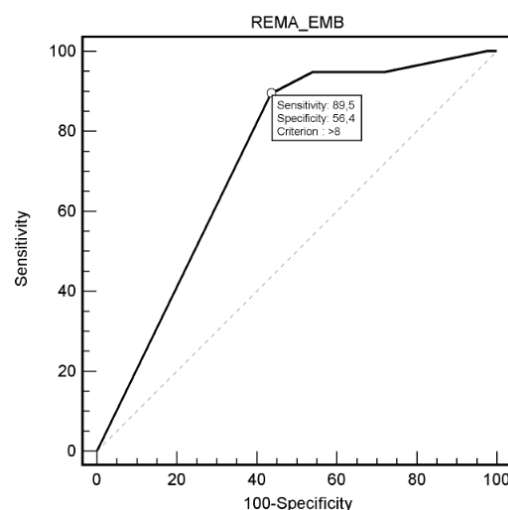


Figura 10 - Curva ROC do ETB determinando os critérios de sensibilidade, especificidade e ponto de corte

4.2.4. Determinação do perfil de susceptibilidade aos fármacos de 80 isolados clínicos

Após a obtenção do valor de ponto de corte, os 80 isolados avaliados pelo REMA foram classificados quanto à sua susceptibilidade aos fármacos. Os resultados dos valores de CIM são apresentados com detalhes nos Apêndices Ia e Ib.

Na Tabela 5, são demonstradas as porcentagens dos perfis de resistência para cada um dos fármacos de forma isolada e para os fármacos de forma combinada. Os dados apresentados nesta tabela exploram todas as combinações possíveis de resultados em relação aos isolados clínicos, não havendo sobreposição de resultados. Observando os resultados de resistência dentre os 80 isolados de *M. tuberculosis*, as porcentagens de resistência variaram de 0 a 10% nos fármacos de forma isolada e de forma combinada, com exceção da resistência simultânea aos quatro fármacos, que apresentou uma alta prevalência com 22 (27,50%) isolados resistentes. Dentre o total de isolados, foi observada uma alta prevalência de isolados MDR, com 7 isolados resistentes à INH e RMP, 4 isolados resistentes à INH, RMP e STR, 6 isolados resistentes à INH, RMP e ETB e 22 isolados resistentes à INH, RMP, STR e ETB, totalizando 39 (48,75%) isolados resistentes pelo menos à INH e RMP.

Tabela 5. Perfis de susceptibilidade de 80 isolados clínicos de *M. tuberculosis* frente aos fármacos do esquema terapêutico apresentando-os isoladamente ou de forma combinada explorando todas as possíveis combinações de resultados

Fármaco(s)	Resistência isolada	Total de isolados
INH	6 (7,50%)	80
RMP	1 (1,25%)	80
STR	0 (0%)	80
ETB	7 (8,75%)	80
INH + RMP	7 (8,75%)	80
INH + STR	8 (10%)	80
INH + ETB	4 (5%)	80
RMP + STR	1 (1,25%)	80
RMP + ETB	0 (0%)	80
STR + ETB	2 (2,5%)	80
INH + RMP + STR	4 (5%)	80
INH + RMP + ETB	6 (7,5%)	80
RMP + STR + ETB	0 (0%)	80
INH + RMP + STR + ETB	22 (27,5%)	80

Na Tabela 6, são demonstradas também as porcentagens dos perfis de resistência para cada um dos fármacos de forma isolada e de forma combinada. A diferença desta Tabela para a Tabela 5, é que os dados apresentados, ilustram os resultados em relação aos fármacos, podendo haver sobreposição de resultados, uma vez que um isolado clínico resistente a mais de um fármaco, foi contabilizado em cada um dos fármacos aos quais ele apresentou resistência. Desta forma, na Tabela 6 foi observada uma maior prevalência de resistência à INH, com 62 (74,7%) isolados resistentes, seguida dos fármacos ETB, STR e RMP, com 47 (58,7%), 43 (53,7%) e 41 (51,2%) isolados resistentes, respectivamente.

Tabela 6. Perfis de susceptibilidade de 80 isolados clínicos de *M. tuberculosis* frente aos fármacos do esquema terapêutico apresentando-os isoladamente com sobreposição de resultados

Fármaco(s)	Resistência	Total de isolados
INH	62 (74,7%)	80
RMP	41 (51,2%)	80
STR	43 (53,7%)	80
ETB	47 (58,7%)	80

4.3. Triagem das mutações utilizando PCR-SSCP

A triagem de mutações associadas com resistência aos fármacos foi realizada através do PCR-SSCP. O número total de isolados e de genes estudados na PCR-SSCP variou conforme o fármaco analisado. Para a INH, foram analisados três genes, sendo *inhA* (Figura 11a), *katG* (Figura 11b) e *ahpC* (Figura 11c) em um total de 63, 62 e 63 isolados, respectivamente. Para a RMP, foi analisado apenas um gene (*rpoB*) (Figura 12), em um total de 46 isolados. Para a STR, foram analisados dois genes (*rpsL* (Figura 13a) e *rrs* (Figura 13b) em um total de 45 e 38 isolados, respectivamente. Finalmente, para o ETB, foi analisado apenas um gene (*embB*) (Figura 14) em um total de 50 isolados. A taxa de mutações encontradas em cada um destes genes e o total de isolados são ilustrados na Tabela 7.

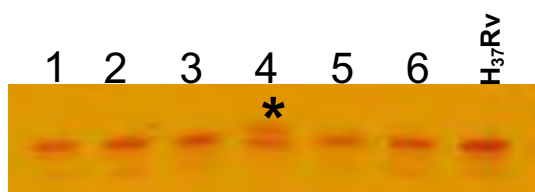


Figura 11a. Gel de SSCP para o gene *inhA* ilustrando com asterisco o isolado com mutação, utilizando como referência a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

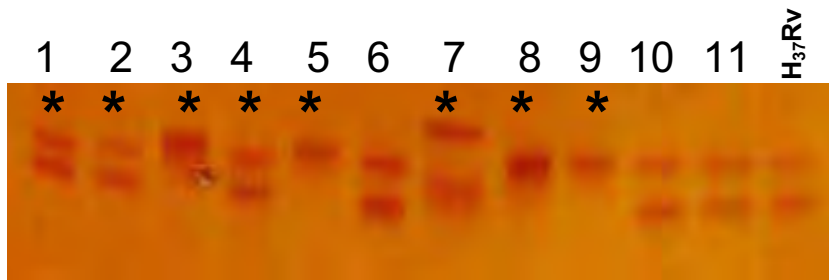


Figura 11b. Gel de SSCP para o gene *katG* ilustrando com asterisco os isolados com mutação, utilizando como referência a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv.



Figura 11c. Gel de SSCP para o gene *ahpC* ilustrando com asterisco o isolado com mutação, utilizando como referência a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

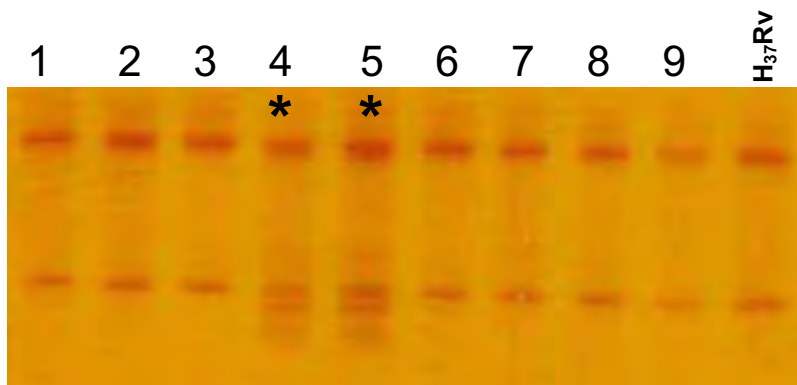


Figura 12. Gel de SSCP para o gene *rpoB* ilustrando com asterisco os isolados com mutação, utilizando como referência a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

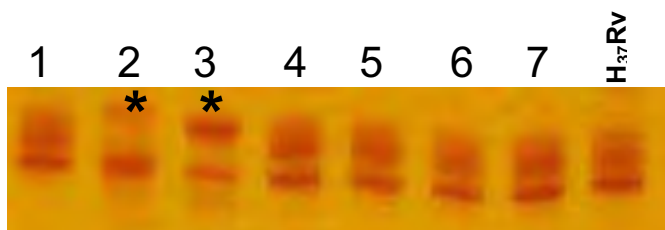


Figura 13a. Gel de SSCP para o gene *rpsL* ilustrando com asterisco os isolados com mutação, utilizando como referência a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

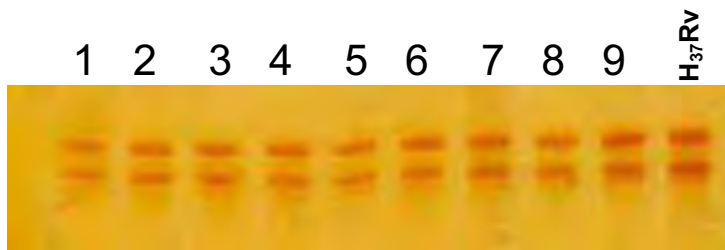


Figura 13b. Gel de SSCP para o gene *rrs* ilustrando os isolados sem mutação, utilizando como referência a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

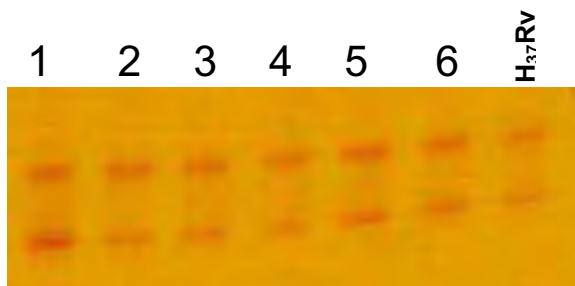


Figura 14. Gel de SSCP para o gene *embB* ilustrando os isolados sem mutação, utilizando como referência a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

Tabela 7. Resultado da PCR-SSCP. São ilustrados os genes de resistência correspondentes a cada fármaco e a taxa de mutação encontrada nos isolados clínicos para cada um dos genes e o total de isolados analisados

Fármaco	Gene	Mutação	Total de isolados
INH	<i>inhA</i>	13 (20,6%)	63
	<i>katG</i>	31 (50%)	62
	<i>ahpC</i>	4 (6,3%)	63
RMP	<i>rpoβ</i>	27 (58,7%)	46
STR	<i>rpsL</i>	9 (20%)	45
	<i>rrs</i>	0 (0%)	38
ETB	<i>embB</i>	0 (0%)	50

4.3.1. Isoniazida

Na resistência à INH, dentro das regiões analisadas, foram encontradas as seguintes mutações: 13 (20,6%) polimorfismos para o gene *inhA*, 31 (50%) polimorfismos para o gene *katG* e 4 (6,3%) polimorfismos para o gene *ahpC*.

Resistência simultânea nos genes *inhA* e *katG* foi encontrada em 1 (2%) isolado e nos genes *katG* e *ahpC* foi encontrada em 2 (3%) isolados. Mutações em quaisquer dos 3 genes considerados neste estudo foram encontradas em 45 (72,6%) isolados.

Na subclassificação realizada dentre os isolados resistentes, nos 10 isolados considerados como de baixa resistência à INH (CIM \leq 1 μ g/mL), 4 (40%) isolados possuíam mutação em pelo menos um dos três genes considerados neste estudo (2 isolados com mutação no gene *inhA*, 1 isolado com mutação no gene *ahpC* e 1 isolado com mutação simultânea nos genes *inhA* e *katG*). Nos 53 isolados considerados como de alta resistência à INH (CIM $>$ 1 μ g/mL), 41 (77,3%) isolados possuíam mutação em pelo menos um dos três genes considerados neste estudo, sendo 28 (52,8%) isolados com mutação no gene *katG*, 10 (18,9%) isolados com mutação no gene *inhA*, 1 (1,9%) isolado com mutação no gene *ahpC* e 2 (3,8%) isolados com mutação nos genes *katG* e *ahpC*, conforme a Tabela 8.

Tabela 8. Resultado da PCR-SSCP nos genes de resistência (*katG*, *inhA* e *ahpC*) indicando a taxa de mutação encontrada nos isolados classificados como de baixa e de alta resistência à INH

Genes	Isolados	
	Baixa resistência	Alta resistência
<i>katG</i>	-	28 (52,8%)
<i>inhA</i>	2 (20%)	10 (18,9%)
<i>ahpC</i>	1 (10%)	1 (1,9%)
<i>katG</i> e <i>ahpC</i>	-	2 (3,8%)
<i>inhA</i> e <i>katG</i>	1 (10%)	-
Total	10	53

4.3.2. Rifampicina

Na resistência à RMP, uma taxa de mutação de 58,7% (27/46) polimorfismos foi encontrada para o gene *rpoβ*. Na subclassificação realizada dentre os isolados resistentes, nos 11 isolados considerados como de baixa resistência à RMP (CIM ≤ 2 µg/mL), 54,5% (6/11) possuíam mutação no gene *rpoβ*. Nos isolados considerados como de alta resistência à RMP (CIM > 2 µg/mL) 60% (18/30) possuíam mutação no gene *rpoβ*, conforme a Tabela 9.

Tabela 9. Resultado da PCR-SSCP no gene de resistência *rpoβ* indicando a taxa de mutação encontrada nos isolados classificados como de alta resistência à RMP

Gene	Isolados	
	Baixa resistência	Alta resistência
<i>rpoβ</i>	6 (54,5%)	18 (60%)
Total	11	30

4.3.3. Estreptomicina

Na resistência à STR, foi encontrada taxa de mutação de 20% (9/45) para o gene *rpsL*, porém para o gene *rrs* não foi encontrada mutação. Na subclassificação realizada dentre os isolados resistentes, nos 24 isolados considerados como de baixa resistência à STR (CIM ≤ 1 µg/mL), 20,8% (5/24) possuíam mutação no gene *rpsL*. Nos isolados considerados como de alta resistência à STR (CIM > 1 µg/mL), 22,2% (4/18) possuíam mutação no gene *rpsL*, conforme a Tabela 10.

Tabela 10. Resultado da PCR-SSCP nos genes de resistência (*rpsL* e *rrs*) indicando a taxa de mutação encontrada nos isolados classificados como de alta resistência à STR

Genes	Isolados	
	Baixa resistência	Alta resistência
<i>rpsL</i>	5 (20,8%)	4 (22,2%)
<i>rrs</i>	-	-
Total	24	18

4.3.4. Etambutol

Na resistência ao ETB, na região analisada, não foram encontradas mutações no gene *embB*, mesmo dentre os 40 isolados considerados como de alta resistência ao ETB (CIM > 16 µg/mL).

4.4. Montagem do painel e seqüenciamento dos isolados clínicos que compõem o painel

A escolha dos isolados clínicos que compõem o painel foi realizada de acordo com os resultados do crescimento em LJ, do REMA e do SSCP, com os resultados apresentados na Tabela 10. No sequenciamento de DNA foram analisados os genes *inhA*, *katG*, *ahpC* e *rpoβ*.

Tabela 10. Resultados de CIM, SSCP e sequenciamento dos 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis* que compõem o painel

Isolado	INH			RMP		
	CIM	<i>inhA</i> SSCP / Seq.	<i>katG</i> SSCP / Seq.	<i>ahpC</i> SSCP / Seq.	CIM	<i>rpoB</i> SSCP / Seq.
15	25	- / -	+ / G>C S ₃₁₅ T	- / -	0,03	X* / X*
45	1	- / -	- / -	- / T>C I ₆ I**	0,015	X* / X*
46	> 25	- / -	+ / G>C S ₃₁₅ T	- / -	1	+ / C>T A>G H ₅₂₆ C
105	1	- / -	- / -	- / -	25	+ / C>T S ₅₃₁ L
104	6,25	- / -	+ / G>C S ₃₁₅ T	- / -	25	+ / C>T S ₅₃₁ L
81	6,25	- / -	+ / G>C S ₃₁₅ T	- / -	6,25	+ / A>T A ₅₁₆ V
76	12,5	- / -	+ / G>C S ₃₁₅ T	- / -	> 25	+ / C>T S ₅₃₁ L
55	25	- / -	+ / G>C S ₃₁₅ T	- / -	> 25	+ / C>T S ₅₃₁ L
61	25	- / C>T A-15T**	+ / -***	+ / C>T H-81T	25	- / C>T S ₅₃₁ L**
84	25	- / -	+ / C>A S ₃₁₅ A	- / -	> 25	+ / C>T S ₅₃₁ L
93	> 25	- / -	- / -	- / -	> 25	+ / C>T S ₅₃₁ L
74	25	- / -	+ / G>C S ₃₁₅ T	- / -	> 25	+ / C>G; A>C H ₅₂₆ P A>C L ₅₂₇ G

* SSCP ou sequenciamento não realizado

** SSCP não detectou a mutação encontrada pelo sequenciamento

*** Sequenciamento não detectou a mutação encontrada pelo SSCP

4.4.1. *inhA*

O sequenciamento da região promotora do gene *inhA* dos 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resultou em 1 isolado (número 61) com mutação do tipo: CGA > TGA no nucleotídeo na posição -15 gerando a troca do aminoácido Arg > Stop (Figura 15). PCR-SSCP não detectou a mutação neste isolado, que apresentou valor de CIM de 25 µg/mL (alta resistência) no REMA.



Figura 15. Seqüenciamento ilustrando a mutação CGA > TGA no gene *inhA* em um isolado.

4.4.2. *katG*

O sequenciamento do gene *katG* dos 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resultou em 8 isolados com mais de um tipo mutação (AGC > ACC no códon 315 gerando a troca do aminoácido Ser > Thr apresentado na Figura 16a e AGC > AGA no códon 315 gerando a troca do aminoácido Ser > Arg representado na Figura 16b). Apesar da detecção por SSCP, o sequenciamento não detectou a mutação no isolado 61 que apresentou valor de CIM de 25 µg/mL (alta resistência) no REMA, devido a uma provável falha na técnica do sequenciamento, que não permitiu a visualização da mutação encontrada na SSCP.



Figura 16a. Seqüenciamento ilustrando a mutação AGC > ACC no gene *katG* em sete isolados.



Figura 16b. Seqüenciamento ilustrando a mutação AGC > AGA no gene *katG* em um isolado.

4.4.3. *ahpC*

O sequenciamento do gene *ahpC* dos 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis* gerou 2 isolados mutados. O isolado 45 apresentou polimorfismo do tipo ATT > ATC no códon 6 gerando uma mutação silenciosa do aminoácido Ile (Figura 17a) e o isolado 61 do tipo CAC > TAC no nucleotídeo na posição -81 gerando a troca do aminoácido His > Tyr (Figura 17b). PCR-SSCP não detectou a mutação silenciosa no isolado 45 que apresentou valor de CIM de 1 µg/mL (baixa resistência) no REMA. No isolado 61 com valor de CIM de 25 µg/mL (alta resistência), houve concordância entre o SSCP e o sequenciamento.

```

GGAGAGTCATGCCACTGCTAACCATCGGCGATCA:TGC5CG
GGAGAGTCATGCCACTGCTAACCATTCGGCGATCAATTC:C
GGAGAGTCATGCCACTGCTAACCATCGGCGATCAATTC:C
  
```

Figura 17a. Sequenciamento ilustrando a mutação ATT > ATC no gene *ahpC* em um isolado.

```

GCCGATAAAATATGGTGTGATATATTACCTTIGCCTGACAGCGACTTCA
GCCGATAAAATATGGTGTGATATATTACCTTIGCCTGACAGCGACTTCA
GCCGATAAAATATGGYGTGATATATTACCTTIGCCTGACAGCGACTTCA
  
```

Figura 17b. Sequenciamento ilustrando a mutação CAC > TAC no gene *ahpC* em um isolado.

4.4.4. *rpoβ*

Com exceção dos isolados 15 e 45 (sensíveis à RMP), os demais isolados de *M. tuberculosis* apresentaram mutações no sequenciamento do gene *rpoβ*. O isolado 46 apresentou mutação do tipo CAC > TGC no códon 526 gerando a troca do aminoácido His > Cys (Figura 18a); 7 isolados (105, 104, 76, 55, 61, 84, e 93) com mutação TCG > TTG no códon 531 ocasionaram a troca do aminoácido Ser > Leu (Figura 18b); o isolado 74 apresentou simultaneamente 3 mutações sendo ACC > ACG no códon 525 gerando uma mutação silenciosa do aminoácido Thr, CAC > CCC no códon 526 gerando a troca do aminoácido His > Pro e AAG > CAG no códon 527 gerando a troca do aminoácido Lys > Gln (Figura 18c) e o isolado 81 com a mutação GAC > GTC no códon 516 gerou a troca do aminoácido Asp > Val (Figura 18d). Neste caso houve 90% de

correlação entre o SSCP e o sequenciamento, uma vez que no isolado 61 a PCR-SSCP não detectou a mutação TCG > TTG, indicando provável erro de leitura ou de detecção no SSCP.

Figura 18a. Sequenciamento ilustrando a mutação CCA > CTG no gene *rpoβ* em um isolado.

Figura 18b. Sequenciamento ilustrando a mutação GTC > GTT no gene *rpoβ* em sete isolados.

Figura 18c. Sequenciamento ilustrando as mutações CCA > GCC e CAA > CCA no gene *rpoβ* em um isolado.

Figura 18d. Sequenciamento ilustrando a mutação GGA > GGT no gene *rpoβ* em um isolado.

4.5. Determinação dos valores de CIM dos compostos Cu-INH₁, Cu-INH₂ e Cu-RMP empregando os 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis* do painel

Os compostos Cu-INH₁, Cu-INH₂ e Cu-RMP que se apresentaram previamente ativos e promissores contra a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv, foram testados frente aos 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis* (resistentes à INH e/ou RMP do painel). Os resultados da CIM são apresentados na Tabela 11.

Como resultado desta análise, os compostos derivados da INH apresentaram atividade intermediária de 12,5 µg/mL, quando os isolados resistentes apresentavam uma baixa resistência à INH. Quando os isolados

apresentam valores de CIM superiores a 6,25 µg/mL, nenhum dos compostos derivados da INH apresentou atividade, com valores de CIM superiores a 25 µg/mL.

Com relação ao composto derivado da RMP, foi observado que nos isolados sensíveis à RMP, houve atividade do composto (0,39 e 1,56 µg/mL). Porém, nos isolados com baixa resistência à RMP, este composto demonstrou uma atividade intermediária de 12,5 µg/mL, resultado semelhante nos compostos derivados da INH. De forma semelhante também, quando os isolados apresentavam valores de CIM superiores a 6,25 µg/mL, o composto derivado da RMP não apresentou atividade, com valores de CIM superiores a 25 µg/mL.

Tabela 11. Resultados expressos em valores de CIM da resistência aos fármacos dos 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis* do painel.

Isolado	REMA ($\mu\text{g/mL}$)		Compostos CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
	INH*	RMP**	Cu- INH ₁	Cu- INH ₂	Cu- RMP
H ₃₇ Rv	0,03	0,03	0,39	0,78	0,31
15	25	0,0625	>25	>25	1,56
45	1	0,015	12,5	25	0,39
46	>25	1	>25	>25	12,5
105	1	25	12,5	25	>25
81	6,25	6,25	>25	>25	>25
104	6,25	25	>25	>25	>25
76	12,5	>25	>25	>25	>25
84	25	>25	>25	>25	>25
93	>25	>25	>25	>25	>25
61	25	25	>25	>25	>25
55	25	>25	>25	>25	>25
74	25	>25	>25	>25	>25

*para INH, isolados de *M. tuberculosis* que apresentaram valores de CIM $\leq 0,0625 \mu\text{g/mL}$ foram considerados sensíveis e valores de CIM $> 0,0625 \mu\text{g/mL}$ foram considerados resistentes; **para RMP, isolados de *M. tuberculosis* que apresentaram valores de CIM $\leq 0,125 \mu\text{g/mL}$ foram considerados sensíveis e valores de CIM $> 0,125 \mu\text{g/mL}$ foram considerados resistentes;

5. DISCUSSÃO

O padrão ouro no diagnóstico da tuberculose no Brasil é o isolamento da bactéria em cultura (LJ ou automatizado) e a identificação das espécies pelo método clássico, com realização posterior dos testes de susceptibilidade aos fármacos (CONDE *et al.* 2009). Porém, este tipo de diagnóstico é moroso, pois a multiplicação bacteriana requer aproximadamente 28 dias (MUSSER, 1995). Para resultados mais rápidos, ensaios moleculares podem ser realizados (TENOVER *et al.* 1993), envolvendo a análise direta do DNA, reduzindo dessa forma o tempo necessário para a identificação e determinação dos padrões de susceptibilidade de *M. tuberculosis* (GARCÍA de VIEDMA, 2003).

A identificação molecular através da amplificação do transposon IS6110, permitiu confirmar quase a totalidade dos isolados (94,3%) como *M.tuberculosis*, em relação à identificação clássica, realizada pelo Instituto Clemente Ferreira. Os demais isolados (6) não identificados pela PCR-IS6110, foram submetidos à identificação pelo PRA, pois segundo van Soolingen *et al.* (1993), mesmo com a ausência do transposon, os isolados podem pertencer ao complexo *M. tuberculosis*. E em algumas linhagens raras, geralmente encontradas no sudeste asiático (DAS *et al.* 1995), não são encontradas cópias do IS6110 (SAHADEVAN *et al.* 1995; YUEN *et al.* 1993; FOMUKONG *et al.* 1994).

No PRA, o isolado 6 foi confirmado como *M. parascrofulaceum*. Esta espécie é considerada micobactéria ambiental e potencialmente patogênica, comportando-se como a maioria das espécies de micobactérias não-causadoras de tuberculose (MNT). Entretanto, de forma semelhante a *M. tuberculosis*, seu alvo preferido parece ser o pulmão, sendo responsável por cavitações em pacientes severamente imunodeprimidos, em particular aqueles com AIDS, onde a espécie pode ser responsável por infecção pulmonar ou disseminada (TORTOLI *et al.* 2005).

A identificação inconclusiva de 5 isolados pelo PRA revelou um fato curioso, que se deve provavelmente, a uma infecção mista de duas micobactérias, uma delas pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* e outra pertencente à espécie *M. abscessus*. Na extração do material genético, provavelmente o DNA de ambas as micobactérias foi extraído, amplificado e submetido à ação das enzimas, gerando fragmentos não compatíveis com uma única espécie. Por se tratar de uma micobactéria ambiental e frequentemente relacionada a infecções humanas (ANVISA, 2007), *M. abscessus* pode ter dado origem a um caso de co-infecção, devido a um enfraquecimento prévio do paciente causado pela tuberculose (DONOGHUE *et al.* 2005). Tanaka *et al.* (2000) identificaram dois casos de co-infecção, um envolvendo *M. tuberculosis* e *M. avium*, e outro envolvendo *M. tuberculosis* e *M. chelonae* e Hsiao *et al.*

(2010) encontraram co-infecção de micobactérias do complexo *M. avium* com micobactérias de crescimento rápido.

Com relação à avaliação do perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* aos fármacos, optou-se pela técnica de REMA, uma vez que, por esta metodologia é possível avaliar o nível de resistência mais próximo do verdadeiro através da determinação do valor de CIM (HEIFETS *et al.* 1988). No método das proporções ou no sistema BACTEC, as concentrações dos fármacos é pontual, não permitindo desta forma a obtenção exata do valor de CIM. Sendo assim, para classificar estes isolados em sensíveis e resistentes aos fármacos analisados pelo REMA, foi necessária a determinação do ponto de corte para cada fármaco, baseada na interpretação da curva ROC utilizando o software MedCalc.

Os valores do ponto de corte obtidos neste trabalho foram menores se comparados aos valores encontrados por outros autores (JADAUN *et al.* 2007; MONTORO *et al.* 2005). Para Siddiqi & Rüsç-Gerdes (2006), os valores encontrados foram de 0,1 µg/mL para INH, 1,0 µg/mL para RMP, 1,0 µg/mL para STR e 5,0 µg/mL para ETB, enquanto Palomino & Martin (2009) encontraram ponto de corte de 0,25 µg/mL para INH, 0,5 µg/mL para RMP, 1,0 µg/mL para STR e 4,0 µg/mL para ETB. As diferenças nos valores de ponto de corte provavelmente se devem ao fato de que as populações bacterianas têm

origens, grau de susceptibilidade e proporção de isolados resistentes diferentes em cada estudo, resultando em valores de pontos de corte divergentes para cada um dos fármacos. Apesar das discrepâncias encontradas, os autores estão de acordo de que o REMA é uma metodologia rápida para a detecção de linhagens MDR (RIVOIRE *et al.* 2007; JADAUN *et al.* 2007; MONTORO *et al.* 2005). A avaliação correta do valor de CIM é extremamente importante, pois uma vez que as linhagens resistentes sejam classificadas como sensíveis, o tratamento não acabará com o sofrimento do paciente e a linhagem se propagará para pessoas saudáveis. Por outro lado, quando uma linhagem sensível é considerada resistente, o paciente será tratado com fármacos mais tóxicos e caros, sobrecarregando o sistema de saúde (AHMAD *et al.* 2009) e o paciente com efeitos colaterais.

Na padronização do REMA, empregando o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 como padrão ouro, foi verificado que, para INH não houve discordância entre as metodologias, resultando em valores de sensibilidade e de especificidade de 100% e excelente correlação entre as metodologias. Na literatura outros autores encontraram resultados semelhantes de sensibilidade e especificidade, com resultados que variaram entre 96 e 100% (NATECHE *et al.* 2006; PALOMINO *et al.* 2002; LUNA-HERRERA *et al.* 2003; MONTORO *et al.* 2005; RIVOIRE *et al.* 2007), assim como excelentes resultados de correlação

(PALOMINO *et al.* 2002; LUNA-HERRERA *et al.* 2003). Os nossos resultados somados aos de outros autores indicam a viabilidade da aplicação do REMA na pesquisa do perfil de susceptibilidade de *M. tuberculosis* à INH, mesmo que o valor de ponto de corte varie entre 0,0625 µg/mL e 0,25 µg/mL e diferentes resultados de sensibilidade e especificidade sejam encontrados na literatura.

Para RMP foi encontrada apenas uma amostra discordante (falso sensível), resultando em um menor valor de sensibilidade e o mesmo valor de especificidade quando comparada à INH, apresentando também excelente correlação entre as metodologias. Na literatura outros autores encontraram resultados semelhantes de sensibilidade e especificidade, com resultados variando entre 95 e 100% (NATECHE *et al.* 2006; PALOMINO *et al.* 2002; LUNA-HERRERA *et al.* 2003; MONTORO *et al.* 2005; RIVOIRE *et al.* 2007), assim como excelentes resultados de correlação (PALOMINO *et al.* 2002; LUNA-HERRERA *et al.* 2003). Os resultados indicam também a viabilidade da aplicação do REMA na pesquisa de isolados resistentes de *M. tuberculosis* à RMP, empregando o valor de ponto de corte de 0,125 µg/mL, mesmo que este valor seja o menor entre os valores de ponto de corte encontrados na literatura.

Para STR foram encontradas 4 amostras discordantes (1 falso resistente e 3 falsos sensíveis), resultando em valores menores tanto de sensibilidade como de especificidade, com excelente correlação entre as metodologias. Na literatura

outros autores encontraram resultados semelhantes de sensibilidade e especificidade, com resultados variando entre 88,5 e 100% (NATECHE *et al.* 2006; PALOMINO *et al.* 2002; LUNA-HERRERA *et al.* 2003; MONTORO *et al.* 2005; RIVOIRE *et al.* 2007), assim como excelente resultado de correlação (LUNA-HERRERA *et al.* 2003).

Para o ETB foram encontradas 26 amostras discordantes (3 falsos resistentes e 23 falsos sensíveis), resultando em um menor valor de sensibilidade e um valor muito baixo de especificidade. Na literatura outros autores encontraram resultados semelhantes de sensibilidade, com resultados variando entre 92 e 98% (JADAUN *et al.* 2007; LUNA-HERRERA *et al.* 2003; MONTORO *et al.* 2005), porém com resultados diferentes de especificidade, com resultados variando entre 98 e 100% (JADAUN *et al.* 2007; LUNA-HERRERA *et al.* 2003). e diferente correlação entre as metodologias (LUNA-HERRERA *et al.* 2003). Em relação à especificidade, MONTORO *et al.* (2005) encontraram 35 falsos resistentes e 1 falso sensível pelo REMA, resultando também em um valor baixo de 57,8%. Uma correlação apenas razoável encontrada neste estudo para ETB entre as metodologias BACTEC e REMA, foi também observada por outros autores em estudos multicêntricos (MADISON *et al.* 2002).

Em relação a acurácia do REMA, a sua determinação é importante, pois se trata de uma metodologia amplamente utilizada por diferentes autores (PALOMINO *et al.* 2002; MARTIN *et al.* 2005), bem como por nosso laboratório para pesquisa de novas drogas (PAVAN *et al.* 2009b; PAVAN *et al.* 2010; SANTOS *et al.* 2009; MORO *et al.* 2009; do NASCIMENTO *et al.* 2009; MAIA *et al.* 2009). Segundo os parâmetros de acurácia usados por Luna-Herrera *et al.* (2003), para INH (valor de 1,0), RMP (valor de 0,997) e STR (valor de 0,951), a técnica de REMA apresentou resultados classificados como de excelente e ETB (valor de 0,734) foi considerado razoável. Segundo Montoro *et al.* (2005), este resultado para ETB pode ser explicado pelo fato deste fármaco sofrer deterioração mais rápida em meio líquido, produzindo resultados menos reprodutíveis e uma sensibilidade menor quando comparado a outros fármacos (GRIFFITH *et al.* 1992).

Após a classificação dos 80 isolados clínicos de *M. tuberculosis* em sensíveis (valores de CIM inferior ou igual ao ponto de corte) ou resistentes (valor de CIM superior ao ponto de corte), foi observada uma alta prevalência de resistência, inclusive de isolados MDR. Os números de casos MDR encontrados neste estudo diferem dos dados da OMS, onde existem 8,5% de casos MDR no mundo e 1% de casos MDR no Brasil (WHO, 2009) e de Agarwal *et al.* (2010), que analisaram 397 isolados, verificando que 114 (28,7%) foram resistentes a

pelo menos um dos quatro fármacos de primeira linha testados e 18 (15,8%) eram MDR. A porcentagem alta de isolados MDR encontrado neste estudo reflete provavelmente a característica do Instituto Clemente Ferreira, que atende principalmente pacientes com histórico de dificuldade no tratamento da tuberculose. Um estudo realizado no período de 1995 a 1998 neste instituto, revelou também uma alta prevalência de casos MDR, contabilizando 182 pacientes (MELO *et al.* 2003), que em sua maioria, são caracterizados por falhas no tratamento, como abandono e prescrições inadequadas (JARDIM *et al.* 2001).

Baseados em uma subclassificação de Palomino *et al.* (2002) e Tudó *et al.* (2010), os isolados resistentes foram reagrupados em isolados de alta ou de baixa resistência para cada fármaco. Nos isolados considerados como de alta resistência, nossos resultados para INH são semelhantes ao de Palomino *et al.* (2002) (83%) e para RMP e STR, nossos resultados são inferiores aos de Palomino *et al.* (2002) (97,9%) e Tudó *et al.* (2010) (88,9%), respectivamente.

Ainda em relação aos valores de CIM encontrados, um dado curioso observado, é que dentre os 62 isolados resistentes à INH, o valor de CIM observado na maioria dos isolados compreendia valores de $CIM \geq 1 \mu\text{g/mL}$ (4 isolados $CIM = 1 \mu\text{g/mL}$ e 44 isolados $CIM > 1 \mu\text{g/mL}$) até elevadíssimas CIMs $> 25 \mu\text{g/mL}$. Para a RIF, fenômeno semelhante foi observado, sendo que dentre

os 41 isolados resistentes, em 4 o valor de CIM foi de 1 µg/mL, em 5 isolados de 2 µg/mL e nos 31 isolados restantes a CIM foi > 2 µg/mL até 25 µg/mL.

Com relação ao estudo de resistência a nível molecular, foi realizada a triagem na pesquisa de mutações utilizando PCR-SSCP nos genes *inhA*, *katG*, *ahpC*, *rpoB*, *rpsL*, *rrs* e *embB*. Para INH, como a maioria dos polimorfismos foi encontrada no gene *katG*, onde na subclassificação realizada, observou-se que 100% das mutações no *katG* resultaram em isolados de alta resistência. Os polimorfismos encontrados no gene *katG* foram seguidos dos polimorfismos encontrados nos genes *inhA* (20,6%) e *ahpC* (6,3%). Concordando com os nossos achados, os autores relacionaram mutação no gene *katG* com altos níveis de resistência (valores de CIM variando de 8 a 32 µg/mL). Mutações no gene *inhA* gerou isolados com alta e/ou com baixa resistência, entretanto, um isolado com mutação simultânea no gene *katG* e *inhA* apresentou resistência alta. Cardoso *et al.* (2004) encontraram mutações no gene *katG* em 83 (85,6%) dos 97 isolados resistentes e em 25,7% dos isolados, mutações no gene *inhA*, dos quais 15,7% possuíam mutações simultâneas no gene *katG*, exatamente na mesma região regulatória deste estudo. Em relação à mutação no gene *ahpC*, dos 4 isolados com esta mutação, em um isolado foi encontrada baixa resistência, em outro isolado alta resistência e nos outros 2 isolados, esta mutação estava associada à mutação no *katG*. Cardoso *et al.* (2004) encontraram mutações em

10 isolados (10,3%) e destes, 9 possuíam mutações simultâneas no gene *katG*, evidência explicada pelo aumento da expressão da proteína AhpC para compensar a perda da atividade pela enzima KatG (RAMASWAMY & MUSSER, 1998; ZHANG *et al.* 1992). Por outro lado, Höfling *et al.* (2005) não encontraram mutações em 19 (39,6%) isolados estudados, indicando que a resistência à INH nestes isolados era mediada por mutações em outras regiões.

Na resistência à RMP, 60% dos isolados resistentes a este fármaco, apresentaram polimorfismos no gene *rpoβ*. Semelhante aos nossos resultados, Negi *et al.* (2009) verificaram presença de mutação no gene *rpoβ* em 77,27% dos isolados. A menor positividade encontrada neste estudo pode ser explicada pelo fato de que foi analisada apenas uma parte do gene *rpoβ*, havendo a possibilidade de que a mutação responsável pela resistência esteja em outras regiões deste mesmo gene (ISFAHANI *et al.* 2006). Na subclassificação foi observada proporção semelhante de isolados com baixa resistência (45,4%) e com alta resistência (63,3%). Hauck *et al.* (2009) observaram que algumas mutações conferem baixos níveis de resistência à RMP. Outros autores relataram níveis de resistência altos (WILLIAMS *et al.* 1998) e baixos (BODMER *et al.* 1995; MA *et al.* 2006) associados com substituições específicas de nucleotídeos. Estas discrepâncias refletem de certa maneira uma interação complexa entre o fármaco e o seu alvo, onde a posição do alelo

afetado parece ser decisiva (BOBADILLA-DEL-VALLE *et al.* 2001) para o nível de resistência.

Com relação à STR, 20% dos isolados resistentes apresentaram polimorfismo no gene *rpsL* ao passo que em nenhum isolado foi encontrado a mutação para o gene *rrs*. Tudó *et al.* (2010) também verificaram presença de mutação no gene *rpsL* em 24,6% dos isolados resistentes à STR. Wu *et al.* (2006) encontraram em 46,7% dos isolados resistentes, mutações em no gene *rpsL* e em 3,4% isolados, mutações no gene *rrs*. Abbadi *et al.* (2009) verificaram mutações no gene *rpsL* em 72% dos isolados resistentes, indicando que as mutações nestes dois genes podem variar consideravelmente ao redor do mundo (WU *et al.* 2006). Na subclassificação realizada neste estudo, os isolados de baixa resistência e de alta resistência apresentam a mesma proporção de mutação, não havendo diferença significativa entre eles, diferentemente de Meier *et al.* (1996) que associaram mutações no gene *rpsL* com altos níveis de resistência e Tudó *et al.* (2010), que também verificaram que todos os isolados com mutações no *rpsL* apresentavam alto valor de CIM (16 µg/mL) para STR.

Na resistência ao ETB, não foi encontrado nenhum polimorfismo no gene *embB*. Outros autores, como Tracevska *et al.* (2004), Abbadi *et al.* (2009) e Chan *et al.* (2007), encontraram respectivamente em 52%, 36,4% e 83% dos isolados alterações no gene *embB*. Entretanto, para Tracevska *et al.* (2004),

PCR-SSCP tem valor limitado na pesquisa de polimorfismos no gene *embB*, e desta forma, os autores não recomendam esta metodologia para identificação rápida de isolados clínicos resistente ao ETB.

Inicialmente, o painel foi montado com 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis*, de acordo com os resultados do crescimento em LJ, do REMA e do SSCP nos genes *inhA*, *katG*, *ahpC* e *rpoβ*, visando a utilização do mesmo frente aos compostos derivados de INH e de RMP, com o intuito de obter de maneira indireta o mecanismo de ação destes compostos. O seqüenciamento foi realizado apenas nestes isolados pertencentes ao painel. Posteriormente, serão incorporados outros isolados já caracterizados com resistência a STR e ETB, para o estudo de mecanismos de ação de novos compostos sintéticos e/ou naturais que apresentem atividade antimicobacteriana. De forma semelhante, Dinakaran *et al.* (2009) montaram um painel com isolados de *M. tuberculosis* MDR, para avaliar novos compostos, encontrando após uma ampla triagem, um composto que demonstrou ser 208 e 1137 vezes mais potente que a INH e a gatifloxacina, respectivamente. Entranto, os autores chamaram a atenção de que há necessidade futura de estudos para a descoberta da estrutura/atividade deste composto e o seu mecanismo de ação.

Com relação ao sequenciamento, entre os 12 isolados clínicos de *M. tuberculosis* do painel, foi encontrado apenas o isolado 61 com mutação na

região promotora do gene *inhA*. Entretanto, não se pode dizer que esta mutação foi responsável pela resistência deste isolado à INH, uma vez que o mesmo apresentou simultaneamente mutação no gene *ahpC* e, provável mutação no gene *katG* (neste caso, detectado apenas pela PCR-SSCP). Cardoso *et al.* (2004) encontraram 23 (23,7%) isolados com mutações nesta mesma posição com a CIM variando entre 2 e 32 µg/mL.

No sequenciamento do gene *katG*, dos 8 isolados mutados, 7 (isolados 15, 46, 104, 81, 76, 55, 74) apresentaram mutação no códon 315 e um (isolado 84) apresentou mutação também no códon 315, mas em outra posição do códon. Estes dois tipos de mutação conferiram aos isolados alta resistência à INH (CIM variando entre 6,25 e > 25 µg/mL). Destaca-se que no isolado 93, com CIM > 25 µg/mL, não foi verificada mutação por PCR-SSCP e por sequenciamento para o gene *katG*. Entretanto, para este isolado, a mutação foi ausente nas duas técnicas também para os genes *inhA* e *ahpC*. Höfling *et al.* (2005) encontraram mutações no códon 315 (*katG*) em 60,4% dos isolados resistentes a INH, com a troca do aminoácido Ser > Thr em 23 casos (47,9%) e Ser > Arg em 6 casos (12,5%). Cardoso *et al.* (2004) identificaram 6 diferentes mutações neste mesmo códon (AGC > ACC, AAC, CGC, ATC, GGC e AGG), com cada mutação com características e perfil eletroforético reproduzível no SSCP. Khadka *et al.* (2007) identificaram 17 (68%) isolados com a mutação Ser > Thr também no códon

315, com alta predominância do alelo ACC (79,3%), que parece ser mais frequente entre isolados com resistência a mais de uma droga e tem maiores CIMs (HÖFLING *et al.* 2005).

No sequenciamento do gene *ahpC* dos 12 isolados clínicos, foram encontrados dois tipos diferentes de mutações: no códon 6 para o isolado 45 (CIM de 1 µg/mL) e no nucleotídeo -81 no isolado 61 (CIM de 25 µg/mL), com mutação simultânea no gene *inhA*. Mutações na região intergênica não podem ser responsáveis por altos valores de CIM, uma vez que o isolado apresentava mutação simultânea no gene *inhA*. De forma semelhante, 9 entre 10 isolados identificados por Cardoso *et al.* (2004) com mutações na região intergênica *oxyR-ahpC* (CIM de 8 µg/mL), possuíam mutações simultâneas no *katG* fora da região do códon 315 e somente 1 isolado não possuía nenhuma mutação adicional.

Ainda com relação à resistência à INH, foi verificado que nos isolados 45 e 105, com valor de CIM de 1 µg/mL, não foi verificada a mutação para os 3 genes analisados pelas duas técnicas (PCR-SSCP e sequenciamento). Provavelmente, a resistência baixa encontrada nestes dois isolados ocorreu devido à mutação em outros locais não pesquisados, ou em decorrência de outros fenômenos atribuídos ao envelope celular em múltiplas camadas ou a um sistema de efluxo multidroga ativo (de ROSSI *et al.* 2006; PALOMINO *et al.*

2007). Provavelmente mutações em outros locais ou mesmo outros mecanismos de resistência, também possam justificativar o alto nível de resistência apresentado pelo isolado 93 (CIM > 25 µg/mL), com ausência de mutação nos três genes analisados.

Para o gene *rpoβ*, o sequenciamento de genes dos componentes do painel revelou ausência de mutação para os isolados 15 e 45, sensíveis à RMP. Por outro lado, todos os 10 isolados resistentes, apresentaram mutação sendo: 7 isolados (105, 104, 76, 55, 61, 84, todos com CIM ≥ 25 µg/mL) com polimorfismo no códon 531, um isolado (74 com CIM > 25 µg/mL) nos códons 525, 526 e 527, e outros dois isolados (46 e 81, com CIM respectivas de 1 µg/mL e 6,25 µg/mL), com mutação nos códons 526 e 516, respectivamente. Nossos dados indicam que mutação no códon 531 do gene *rpoB* geram isolados com altíssima resistência à RMP (CIM ≥ 25 ug/mL). Na literatura, essa afirmação é corroborada por Lipin *et al.* (2007), que encontraram a frequência de 89% de mutação no códon 531; por Höfling *et al.* (2005), onde as mutações que mais prevaleceram nos códons foram: códon 531 em 60% dos isolados, códon 526 em 24%, códons 533 e 516 em 4% e uma inserção de dois códons 514 e 515 também em 4%; por Valim *et al.* (2000) e Ramaswamy & Musser (1998), que encontraram a mutação no códon 531 em 50-56% e 41% dos isolados, respectivamente.

O painel contendo os isolados clínicos devidamente caracterizados foi construído com o intuito de se obter, de maneira indireta, mecanismos de ação de compostos que apresentaram ação antimicobacteriana previamente. Neste estudo, este painel foi aplicado para determinar a atividade antituberculose dos compostos Cu-INH₁, Cu-INH₂ e Cu-RMP, que se apresentaram previamente ativos e promissores contra a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Mas em outros estudos, outros compostos já foram aplicados neste painel, gerando resultados muito interessantes.

Os compostos derivados de INH (Cu-INH₁, Cu-INH₂), ao serem testados com isolados resistentes à INH, mostraram-se pouco efetivos. Entretanto, é possível verificar que os compostos foram mais ativos contra os isolados 45 e 105 (CIM de 12,5 µg/mL). Nos demais casos, o valor de CIM foi > 25 µg/mL. Os isolados 45 e 105, apresentaram baixa resistência a INH (1,0 µg/mL), nenhuma mutação nos genes *katG* e *inhA* e apenas uma mutação silenciosa no gene *ahpC* (isolado 45). Por estes dados, é possível inferir que os mesmos fatores responsáveis pela baixa resistência à INH (encontrados nos isolados 45 e 105), conferiram esta resistência intermediária aos novos compostos. Por outro lado, qualquer mutação no gene *katG*, no códon 315 seja ela S₃₁₅T ou S₃₁₅A, possibilita ao isolado resistência a estes novos compostos. O gene *katG* codifica a enzima catalase-peroxidase responsável pela ativação da INH (ROZWARSKI

et al. 1998; RAWAT *et al.* 2003). A mutação no gene *katG* leva a formação de enzima parcial ou totalmente inoperante, incapaz de ativar o pro-fármaco INH. Do exposto, o composto derivado da INH, apesar de sua modificação estrutural, provavelmente manteve a sua característica de pro-fármaco, dependendo ainda da enzima catalase para a sua ativação.

Em relação ao composto derivado de RMP (Cu-RMP), nos dois isolados (15 e 45) sensíveis à RMP, o composto apresentou CIM bastante promissor, de 1,56 µg/mL e 0,39 µg/mL, respectivamente. Entretanto, ao ser testado frente aos isolados resistentes, o valor de CIM saltou para 12,5 µg/mL (no isolado 46) e > 25 µg/mL (nos demais isolados). O isolado 46 apresentou mutação no códon 526 e os demais no códon 531, excetuando o isolado 81, com mutação no códon 516. A RMP interfere na síntese de RNA através da sua ligação à subunidade β da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB* e mutações neste gene originam uma menor afinidade desta subunidade à RMP (ZHANG & YEW, 2009). Mutação no códon 531 no gene *rpoB* tem sido indicado por diferentes autores como responsável por alto nível de resistência à RMP (DOUSTDAR *et al.* 2008; BOBADILLA-DEL-VALLE *et al.* 2001; SARIBAS *et al.* 2003). Neste estudo, foi verificado que os isolados com CIM > 25 µg/mL e mutação no códon 531, também apresentaram alta resistência para o composto Cu-RMP, com CIM > 25 µg/mL. Estes resultados indicam que o composto derivado de RMP manteve o

mesmo mecanismo de ação da RMP, provavelmente se ligando ao mesmo sítio da subunidade β da RNA polimerase.

De forma geral, o painel foi utilizado com sucesso na obtenção indireta dos mecanismos de ação para os compostos derivados de INH e RMP. Como citado anteriormente, outros compostos já foram testados e outros ainda serão testados, com o objetivo de explorar e conhecer os mecanismos de ação destes compostos. Mais isolados serão incluídos neste painel e novas caracterizações serão realizadas, como teste de susceptibilidade a outros fármacos e o seqüenciamento de outros genes que conferem resistência aos fármacos já utilizados e de novos fármacos que serão incluídos no estudo.

6. CONCLUSÕES

A técnica do REMA demonstrou ser um teste rápido, sensível e específico para determinar o perfil de resistência dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* frente à INH e RMP, com excelente correlação com o sistema BACTEC.

O valor do ponto de corte obtido pela análise da curva ROC pode variar de acordo com a característica da população microbiana estudada.

Para a STR, o desempenho da técnica do REMA é inferior à apresentada para INH e RMP, sendo que para o ETB, esta técnica não apresentou boa correlação entre as metodologias.

A técnica da PCR-SSCP possibilita uma triagem rápida dos isolados com resistência à INH e RMP, através da pesquisa de mutação nos genes *inhA*, *katG*, *ahpC* e *rpoB*, não sendo favorável para pesquisar genes responsáveis pela resistência à STR e ETB.

O seqüenciamento é uma ferramenta importante na procura de mutações responsáveis pela resistência, uma vez que encontrou mutações não detectadas por PCR-SSCP e comprovou as mutações já detectadas por PCR-SSCP.

No nosso estudo, a alta resistência dos isolados de *M. tuberculosis* à INH esta relacionada com a mutação no gene *katG*, principalmente no códon 315.

Nos nossos isolados, a mutação no gene *rpoB*, no códon 531 é responsável pelo alto nível de resistência à RMP.

O painel contendo isolados de *M. tuberculosis* caracterizados fenotípica e genotipicamente quanto ao perfil de susceptibilidade à INH e RMP,

possibilitaram avaliar com sucesso, mesmo que indiretamente, os mecanismos de ação das novas drogas, principalmente dos derivados destes fármacos.

Os compostos Cu-INH₁ e Cu-INH₂, derivados da INH provavelmente dependem da enzima catalase/peroxidase para sua ativação, uma vez que isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH com mutação no gene *katG* também foram resistentes aos compostos.

O composto Cu-RMP derivado de RMP, provavelmente é ainda dependente da conformação da subunidade β da RNA polimerase micobacteriana uma vez que isolados de *M. tuberculosis* resistentes à RMP com mutações no gene *rpoB* também foram resistentes ao composto.

7. PUBLICAÇÕES

SILVA P, MIYATA M, SATO DN, SANTOS AC, MENDES NH, LEITE CQF. *Rhodococcus equi* isolation from sputum of patients with suspected tuberculosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**,v.105, n.2, p.199-202, 2010.

MIYATA M; SANTOS AC; MENDES NH; CUNHA EA; MELO FAF; LEITE CQF. Evaluation of the quality of DNA extracted by two techniques for *Mycobacterium tuberculosis* molecular identification and genotyping. **Braz. J. Microbiol.**, 2010. (in press)

MIYATA M; PAVAN FR; SATO DN; CARDOSO RF; HIRATA MH; LEITE CQF. Validation of *cut-off* value from MIC utilizing REMA in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in a population with high incidence of MDR strains: comparison of proportion method and resazurin microtitre assay (em elaboração)

MIYATA M; PAVAN FR; BENTO P; FREM RC; SATO DN; HIRATA MH; LEITE CQF. Evaluation of new drugs anti-Tb of INH and RMP derivatives by a panel of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates (em elaboração)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADI, S.H.; SAMEAA, G.A.; MORLOCK, G.; COOKSEY, R. C. Molecular identification of mutations associated with anti-tuberculosis drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 13, n.6, p.673-678, 2009.

AGARWAL, M.; GUNAL, S.; DURMAZ, R.; YANG, Z. Integration of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing and genotyping with epidemiological data analysis to gain insight into the epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Malatya, Turkey. **J. Clin. Microbiol.**, v.48, n.9, p. 3301-330, 2010.

AHMAD, S.; JABER, A.A.; MOKADDAS, E. Frequency of *embB* codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and -resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait. **Tuberculosis**, v.87, n.2, p.123-129, 2007.

ALCAIDE, F.; PFYFFER, G.E.; TELENTI A. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.41, p.2270–2273, 1997.

AUSUBEL F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. et al. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates New York: John Wiley & Sons, 1989.

BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; UM, K.S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; DE LISLE, G.; JACOBS, W.R. Jr.

inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v.263, n.5144, p.227-230, 1994.

BLOOM, B.R. Back to a frightening future. **Nature**, v.358, p.538-539, 1992.

BOBADILLA-DEL-VALLE, M.; PONCE-DE-LEON, A.; ARENAS-HUERTERO, C.; VARGAS-ALARCON, G.; KATO-MAEDA, M.; SMALL, P.M.; COUARY, P.; RUIZ-PALACIOS, G.M.; SIFUENTES-OSORNIO, J. *rpoB* gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism. **Emerg. Infect. Dis.**, v.7, n.6, p.1010-1013, 2001.

BODMER, T.; ZURCHER, G.; IMBODEN, P. et al. Mutation position and type of substitution in the beta-subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chem**, v.35, p.345–348, 1995.

CARDOSO, R.F.; COOKSEY, R.C.; MORLOCK, G.P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C.Q.F.; SATO, D.N.; SHIKAMA, M.L.; MAMIZUKA, E.M.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v.48, p.3373-381, 2004.

CHAN, R.C.; HUI, M.; CHAN, E.W.; AU, T.K.; CHIN, M.L.; YIP, C.K.; AUYEANG, C.K.; YEUNG, C.Y.; KAM, K.M.; YIP, P.C.; CHENG, A.F. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium*

tuberculosis isolates in Hong Kong. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.59, n.5, p. 866-873, 2007.

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

CONDE, M.B.; SOUZA, G.M.; KRITSKI, A.L. Tuberculose sem medo. São Paulo: Atheneu, 2002.

CONDE, M. B. et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **J. Bras Pneumol.** [online] ,v.35, n.10, p.1018-1048, 2009.

COOKSEY, R.C.; MORLOCK, G.P.; McQUEEN, A. et al. Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. **Antimicrob Agents Chemother**, v.40, p.1186–1188, 1996.

DANIEL, T.M. The history of tuberculosis. **Respir Méd**, v.100, p.1862-1870, 2006.

DAS, S.; PARAMASIVAN, C.N.; LOWRIE, D.B.; PRABHAKAR, R.; NARAYANAN, P.R. IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, south India. **Tuberc Lung Dis**, v.76, p.550-554, 1995.

DAVIES, J.; GORINI, L.; DAVIS, B. Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. **Mol. Pharmacol.**, v.1, n.1, p.93–106, 1965.

DINAKARAN, M.; SENTHILKUMAR, P.; YOGEE SWARI, P.; SRIRAM, D. Antitubercular activities of novel benzothiazolo naphthyridone carboxylic acid derivatives endowed with high activity toward multi-drug resistant tuberculosis. **Biomed Pharmacother.**, v.63, n.1, p.11-8, 2009.

DONOGHUE, H.D.; MARCSIK, A.; MATHESON, C.; VERNON, K.; NUORALA, E.; MOLTO, J.E.; GREENBLATT, C.L.; SPIGELMAN, M. Co-infection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* in human archaeological samples: a possible explanation for the historical decline of leprosy. **Proc Biol Sci**, v.272, n.1561, p.389-94, 2005.

DOUSTDAR, F.; KHOSRAVI, A.D.; FARNIA, P.; BAHRMAND, A.R.; MASJEDI, M.R.; VELAYATI, A.A. Rifampin Resistant Mycobacterium Tuberculosis Isolates in Iran. **Tanaffos**, v.7, n.2, p.11-17, 2008.

van EMBDEN, J.D.A.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.T.; DALE, J.W.; EISENACH, K.D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; McADAM, R.; SHINNICK, T.M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J Clin Microbiol**, v.31, p.406-9, 1993.

FAI, P.B. & GRANT, A. A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. **Chemosphere**, v.74, p.1165–1170, 2009.

FINKEN, M.; KIRSCHNER, P.; MEIER, A.; WREDE, A.; BOTTGER, E.C. Molecular basis of streptomycin resistance in *Silva*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. **Mol Microbiol**, v.9, p.1239-46, 1993.

FOMUKONG, N.G., TANG, T.H. AL-MAAMARY, S.; IBRAHIM, W.A.; RAMAYAH, S.; YATES, M.; ZAINUDDIN, Z.F.; DALE, J.W. Insertion sequence typing of *M. tuberculosis*: characterization of a widespread subtype with a single copy of IS6110. **Tubercle Lung Dis.**, v.75, p.399–468, 1994.

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

FRIEDEN, T.R.; STERLING, T.R.; MUNSIFF, S.S.; WAFF, C.J.; DYE, C. Tuberculosis. **Lancet**, v.362, n.9387, p.887-99, 2003.

FUSEGAWA, H.; MIYACHI, H.; OHSHIMA, T.; MASUKAWA, A.; SATO, H.T.; ANDO, Y. Rapid detection and identification of mycobacteria by the PCR assay based on the co-amplification of the gene IS6110 and *groEL*. **Rinsho Byori**, v.43, n.10, p.1051-6, 1995.

GARCÍA de VIEDMA, D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. **Clin Microbiol Infect**, v.9, n.5, p.349-59, 2003.

GILLERON, M.; JACKSON, M.; NIGOU, J.; PUZO, G. Structure, biosynthesis, and activities of the phosphatidyl-myo-inositol-based lipoglycans. In: Daffe M, Reytrat JM, editors. The mycobacterial cell envelope. Washington, DC: ASM Press, p.75-105, 2008.

GRIFFITH, M.E.; BODILY, H.L. Stability of antimycobacterial drugs in susceptibility testing. **Antimicrob Agents Chemother**, v.36, p.2398-402, 1992.

HAUCK, Y.; FABRE, M.; VERGNAUD, G.; SOLER, C.; POURCEL, C. Comparison of two commercial assays for the characterization of *rpoB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* and description of new mutations conferring weak resistance to rifampicin. **J. Antimicrob. Chemother**, v.64, n. 2, p.259-62, 2009.

HAYASHI, K.; YANDELL, D.W. How sensitive is PCR-SSCP? **Human Mutation**, v.2, p.338-346, 1993.

HAZBON, M.H.; BRIMACOMBE, M.; BOBADILLA-DEL VALLE, M. et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**,v.50, p.2640-2649, 2006.

HERRERA, L.; VALVERDE, A.; SAIZ, P.; SÁEZ-NIETO, J.A.; PORTERO, J.L.; JIMÉNEZ, M.S. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in the Philippines. **Int J Antimicrob Agents**, v.23, n.6, p.572-576, 2004.

HEIFETS, L.B. Qualitative and quantitative drug susceptibility tests in mycobacteriology. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.137, p.1217-1222, 1988.

HEIFETS, L.B.; DESMOND, E. Clinical mycobacteriology laboratory. IN: COLE, S.; EISENACH, K.; MCMURRAY, D.; JACOBS, W. Jr. (Ed.) Tuberculosis and the tubercle bacillus. Washington DC, USA: ASM Press, p 49-70, 2005.

HEYM, B.; ALZARI, P.M; HONORE, N. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol. Microbiol.**, v.15, p.235–245, 1995.

HEYM, B.; HONORE, N.; TRUFFOT-PERNOT, C. et al. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. **Lancet**, v.344, p.293-B, 1994.

HÖFLING, C.C.; PAVAN, E.M.; GIAMPAGLIA, C.M.S.; FERRAZOLI, L.; AILY, D.C.G.; 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.**, v.9, n.1, p.87-93, 2005.

HONGYO, T.; BUZARD, G.; CALVERT, R. ; WEGHORST, C. «Cold SSCP»: A simple, rapid, and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. **Nucleic Acids Res.**, v.21,p.3637–3642, 1993.

HSIAO, C.H.; LIN, Y.T.; LAI, C.C.; CHOU, C.H.; HSUEH, P.R. Identification of nontuberculous mycobacterial infection by IS6110 and *hsp65* gene analysis on lung tissues. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.68, n.3, p.241-246, 2010.

ISFAHANI, B.N.; TAVAKOLI, A.; SALEHI, M.; TAZHIBI, M. Detection of rifampin resistance patterns in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Iran by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism and direct sequencing methods. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, n.6, p.597-602, 2006.

JADAUN, G.P.S.; AGARWAL, C.; SHARMA, H.; AHMED, Z.; UPADHYAY, P.; FAUJDAR, J.; GUPTA, A.K.; DAS, R.; GUPTA, P.; CHAUHAN, D.S.; SHARMA, V.D.; KATOCH, V.M. Determination of ethambutol MICs for *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* isolates by resazurin microtitre assay. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 60, p.152-155, 2007.

JARDIM, P.C.R.; ZAMARIOLI, L.A.; COELHO, A.G.V.; FIGUEIREDO, T.R.; ROZMAN, M.A. Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas do município de São Vicente. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.60, n.2, p.119-123, 2001.

JIN, D.J.; GROSS, C.A. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. **J. Mol. Biol.** v.202, n.1, p.45-58, 1988.

KAKAVAS, V.K.; PLAGERAS, P.; VLACHOS, T.A.; PAPAIOANNOU, A.; NOULAS, V.A. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. **Mol. Biotechnol.**, v.38, n.2, p.155-163, 2008.

KATTAMIS, C.; CHENG, H.H.; REESE, A.L.; GONZALEZ-REDONDO, J.M.; KUTLAR, A.; KUTLAR, F.; HUISMAN, T.H.J. Molecular characterization of b-thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. **British J Haematol.**, v.74, p.342–346, 1990.

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

KHADKA, D.K.; EAMPOKALAP, B.; PANITCHAKORN, J.; RAMASOOTA, P.; KHUSMITH, S. Multiple mutations in *katG* and *inhA* identified in Thai isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.**, v.38, n.2, p.376-382, 2007.

KUSAKABE, T.; MAEKAWA, K.; ICHIKAWA, A.; UESUGI, M; SUGIURA, Y. Conformation-selective DNA strand breaks by dynemicin: A molecular wedge into flexible regions of DNA. **Biochemistry**, v.32, n.43, p.11669–11675, 1993.

LIPIN, M.Y.; STEPANSHINA, V.N.; SHEMYAKIN, I.G.; SHINNICK, T.M. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.13, n.6, p.620-626, 2007.

LOMOVSKAYA, O.; BOSTIAN, K.A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinica - a vision for applied use. **Biochem. Pharmacol.**, v.71, p.910-918, 2006.

LUNA-HERRERA, J.L.; CABRERA, M.G.; MALDONADO, R.P.; MORENO, J.A.E.; LOPES, J.T.; PASCUAL, F.Q.; POLANDO, R.D.; FRANZBLAU, S.G. Use of Receiver Operating Characteristic Curves to Assess the Performance of a Microdilution Assay for Determination of Drug Susceptibility of Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.22, n.1, p.21-27, 2003.

MA, X.; WANG, H.; DENG, Y. *et al.* *rpoB* gene mutations and molecular characterization of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Shandong Province, China. **J Clin Microbiol**, n.44, p.3409–12, 2006.

MACCARI, R.; OTTANA, R.; MONFORTE, F.; VIGORITA, M.G. *In vitro* antimycobacterial activities of 2'-monosubstituted isonicotinohydrazides and their cyanoborane adducts. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, n.2, p.294-9, 2002.

MACCARI, R.; OTTANA, R.; VIGORITA, M.G. *In vitro* advanced antimycobacterial screening of isoniazid-related hydrazones, hydrazides and cyanoboranes: part 14. **Bioorg Med Chem Lett**, v.15, n.2509-13, 2005.

MADISON, B.; ROBINSON-DUNN, B.; GEORGE, I.; GROSS, W.; LIPMAN, H.; METCHOCK, B.; SLOUTSKY, A.; WASHABAUGH, G.; MAZUREK, G.; RIDDERHOF, J. Multicenter Evaluation of Ethambutol Susceptibility Testing

of *Mycobacterium tuberculosis* by Agar Proportion and Radiometric Methods. **J Clin Microbiol**, v.40, n.11, p.3976-3979, 2002.

MAIA, P.I.S.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F.; LEMOS, S.S.; SOUZA, G.F.; BATISTA, A.A.; NASCIMENTO, O.R.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E.; NIKET, E.; DEFLON, V.M. Vanadium complexes with thiosemicarbazones: Synthesis, characterization, crystal structures and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Polyhedron**, v.28, p.398-406, 2009.

MARTIN, A.; MORCILLO, N.; LEMUS, D.; MONTORO, E.; da SILVA TELLES, M.A.; SIMBOLI, N.; PONTINO, M.; PORRAS, T.; LEÓN, C.; VELASCO, M.; CHACON, L.; BARRERA, L.; RITACCO, V.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. **Int J Tuberc Lung Dis**, n.9, n.8, p.901-906, 2005.

McEVOY, C.R.; FALMER, A.A.; GEY VAN PITTIUS, N.C.; VICTOR, T.C.; VAN HELDEN, P.D.; WARREN, R.M. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v.87, n.5, p.393-404, 2007.

MEIER, A.; SANDER, P.; SCHAPER, K.J.; SCHOLZ, M.; BÖTTGER, E.C. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.40, n.11, p.2452-4, 1996.

MELO, F.A.M.; AFIUNE, J.B.; NETO, J.I.; ALMEIDA, E.A.A.; SPADA, D.T.A.; ANTELMO, A.N.L.; CRUZ, M.L. Aspectos epidemiológicos da

tuberculose multiresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.36, n.1, 2003.

MENDEZ, M.P.; LANDON, M.E.; MCCLOUD, M.K.; DAVIDSON, P.; CHRISTENSEN, P.J. Co-infection with pansensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **E Emerg Infect Dis**, v.15, n.4, p.578-80, 2009.

MERRIL, C.R. Silver staining of proteins and DNA. **Nature**, v.343, p.779–780, 1990.

MIDDLEBROOK, G. Isoniazid resistance and catalase activity of tubercle bacilli. **Am Rev Tuberc**, v.69, p.471–472, 1954.

MIKUSOVA, K.; SLAYDEN, R.A.; BESRA, G.S.; BRENNAN, P.J. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. **Antimicrob Agents Chemoter**, v.39, p.2484-9, 1995.

MITCHISON, D.A. The action of anti-tuberculosis drugs in short course chemotherapy. **Tubercle**, v.66, p.219–225, 1985.

BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE: MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tuberculose: guia de vigilância epidemiológica/elaborado pelo Comitê Técnico – Científico de Assessoramento à Tuberculose e Comitê Assessor para Co-infecção HIV-Tuberculose. Brasília, 2002. 100 p.

MONTORO, E.; LEMUS, D.; ECHEMENDIA, M. *et al.* Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for the drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother**, v.55, p.500-5, 2005.

MOORE, D.A.; EVANS, C.A.; GILMAN, R.H.; CAVIEDES, L.; CORONEL, J.; VIVAR, A.; SANCHEZ, E.; PINEDO, Y.; SARAVIA, J.C.; SALAZAR, C.; OBERHELMAN, R.; HOLLM-DELGADO, M.G.; LACHIRA, D.; ESCOMBE, A.R.; FRIEDLAND, J.S. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. **N Engl J Med**, v.355, p.1539-1550, 2006.

MORO, A.C.; MAURO, A.E.; NETTO, V.G.N.; ANANIAS, S.R.; QUILLES, M.B.; ZEPPONE, I.C.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F.; HÖRNER, M. Antitumor and antimycobacterial activities of cyclopalladated complexes: X-ray structure of [Pd(C₂N-dmba)(Br)(tu)] (dmba = N,N-dimethylbenzylamine, tu = thiourea). **Eur J Med Chem**, v.44, p.4611-15, 2009.

MUÑOZ-ELÍAS, E.J. & MCKINNEY, J.D. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. **Nat Med**, v.11, p.638–644, 2005.

MURPHY, D.J.; BROWN, J.R. Identification of gene targets against dormant phase *Mycobacterium tuberculosis* infections. **BMC Infect Dis**, v.7, n.84, 2007.

MUSSER, J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. **Clin Microbiol Rev**, v.8, p.496-514, 1995.

NAIR, J.; ROUSE, D.A.; BAI, G.H. *et al.* The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Microbiol**, v.10, p.521–527, 1993.

do NASCIMENTO, F.; VONPOELHSITZ, G.; PAVAN, F.R.; SATO, D.N.; LEITE, C.Q.F.; ARAUJO, S.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E.; DEFLON, V.; BATISTA, A. Synthesis, characterization, X-ray structure and in vitro antimycobacterial and antitumoral activities of Ru(II) phosphine/diimine complexes containing the SpymMe₂ ligand, SpymMe₂=4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine. **J Inorg Biochem**, v.102, n.9, p.1783-89, 2008.

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

NEGI, S.S.; SINGH, U.; GUPTA, S.; KHARE, S.; RAI, A.; LAL, S, Characterization of *rpoB* gene for detection of rifampicin drug resistance by SSCP and sequence analysis. **Indian J Med Microbiol**, v.27, n.3, p.226-30, 2009.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**, v.267, n.17, p.5421-6, 2000.

ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Rapid and sensitive detection and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. **Genomics**, v.5, n.4, p.874–879, 1989.

PALOMINO, J.C.; MARTIN A. Institute of Tropical Medicine, Mycobacteriology Unit Antwerp, Belgium. VERSION 03-2009, 17 pp. 2009.

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

PALOMINO, J.C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. Tuberculosis: from basic science to patient care. Belgium, Brazil and Argentina, 687 p. 2007.

PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F.; COELHO, R.G.; COUTINHO, I.D.; HONDA N.K.; CARDOSO, C.A.L.; VILEGAS, W.; LEITE, S.R.A.; SATO, D.N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, v.32, p.1222-1226, 2009b.

PAVAN, F.R.; POELHSITZ, G.V.; do NASCIMENTO, F.B.; LEITE, S.R.A.; BATISTA, A.A.; DEFLON, V.M.; SATO, D.N.; FRANZBLAU, S.G.; LEITE, C.Q.F. Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **Eur J Med Chem**, v.45, p.598-601, 2010.

RAMASWAMY, S.V.; AMIN, A.G.; GOKSEL, S. *et al.* Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphism associated with ethambutol resistance in

human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.44, p.326-36, 2000.

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

RAMASWAMY, S.V.; REICH, R.; DOU, S.J. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemoter**, v.47, p.1241-50, 2003.

RAMÓN-GARCÍA, S.; MARTÍN, C.; THOMPSON, C.J.; AÍNSA, J.A. Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 Efflux Pump in Intrinsic Drug Resistance, Oxidative Stress Responses, and Growth. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.9, p.3675, 2009.

RAWAT, R.; WHITTY, A.; TONGE, P.J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. **Proc Natl Acad Sci**, v.100, p.13881–13886, 2003.

RINDER, H.; DOBNER, P.; FELDMANN, K.; RIFAI, M.; BRETZEL, G.; RÜSCH-GERDES, S.; LÖSCHER, T. Disequilibria in the distribution of *rpoB* alleles in rifampicin-resistant *M. tuberculosis* isolates from Germany and Sierra Leone. **Microbiol. Drug Resist**, v.3, n.2, p.195-197, 1997.

RIVOIRE, N.; RAVOLOLONANDRIANA, P.; RASOLONAVALONA, T.; MARTIN, A.; PORTAELS, F.; RAMAROKOTO, H.; RASOLOFO RAZANAMPARANY, V. Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. **Int. J Tuberc Lung. Dis.**, v.11, n.6, p.683-688, 2007.

de ROSSI, E.; AÍNSA, J.A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. **FEMS Microbiol Rev** v.30, n.1, p.36-52, 2006.

ROZWARSKI, D.A.; GRANT, G.A.; BARTON, D.H. et al. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v.279, p.98–102, 1998.

SAHADEVAN, R.; NARAYANAN, S.; PARAMASIVAN, C.N.; PRABHAKAR R.; NARAYANAN, P.R. Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.11, p.3037-3039, 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. cold spring harbor laboratory. CHL Press, 2001. 999 p.

SANTOS, J.L.; YAMASAKI, P.R.; CHIN, C.M.; TAKASHI, C.H.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q. F. Synthesis and in vitro anti *Mycobacterium tuberculosis* activity of a series of phthalimide derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v.17, n.1, p.3795-3799, 2009.

SARIBAŞ, Z.; KOCAGÖZ, T.; ALP, A.; GÜNALP, A. Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates by heteroduplex analysis **and** determination of rifamycin cross-resistance in rifampin-resistant isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.2, p.816-818, 2003.

SHAHARYAR, M.; SIDDIQUI, A.A.; ALI, M.A.; SRIRAM, D.; YOGEE SWARI, P. Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of N1-nicotinoyl-3-(4'-hydroxy-3'-methyl phenyl)-5-[(sub)phenyl]-2-pyrazolines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.16, p.3947-3949, 2006.

SHERMAN, D.R.; MDLULI, K.; HICKEY, M.J.; BARRY, C. E III.; STOVER, C.K. AhpC, oxidative stress and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biofactors**, v.10, n.2-3, p.211-217, 1999.

SCHINNICK, T. The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol.**, v.169, p.1080-1088, 1987.

SIDDIQUI, S.H. (BD Fellow, Sparks, Maryland, USA), RÜSCH-GERDES, S. (National Reference Center for Mycobacteria, Borstel, Germany). BACTEC™ MGIT 960™ TB System Manual. 2006.

SILVA P.E.; BIGI, F.; SANTANGELO, M. P. et al. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, p.800-804, 2001.

van SOOLINGEN, D.; HAAS, P.E.; HERMANS, P.W.; GROENEN, P.M.; van EMBDEN, J.D. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic

markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.8, p.1987-1995, 1993.

SREEVATSAN, S.; STOCKBAUER, K.E.; PAN, X.; KREISWIRTH, B.N.; MOGHAZEH, S.L.; JACOBS, W.R. Jr.; TELENTI, A.; MUSSER, J.M. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.41, n.8, p.1677-1681, 1997.

SRIVASTAVA, S.; GARG, A.; AYYAGARI, A.; NYATI, K.K; DHOLE T.N; DWIVEDI, S.K. Nucleotide polymorphism associated with ethambutol resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr Microbiol.**, v.53, p.401-405, 2006.

SUN, Y.J.; LEE, A.S.; WONG, S.Y.; PATON, N.I. Analysis of the role of *Mycobacterium tuberculosis kasA* gene mutations in isoniazid resistance. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.13, n.8, p.833-835, 2007.

TAKAHASHI, A.; ISHINO, Y.; KATO, Y.; FUKUMAKI, Y. Rapid and practical detection of β -globin mutations causing β thalassemia by fluorescence-based PCR-single strand conformation polymorphism analysis. **Mol. Cell. Probes**, v.8, p.385–393, 1994.

TAKAYAMA, K.; KILBURN, J.O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob Agents Chemoter.**, v.33, p.1493-1499, 1989.

TANAKA, I.I.; ANNO, I. S.; LEITE, S.R.; COOKSEY, R.C.; LEITE, C.Q.F. Comparison of a multiplex-PCR assay with mycolic acids analysis and conventional methods for the identification of mycobacteria. **Microbiol Immunol.**, v.47, n. 5, p.307-312, 2003.

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

TELENTI, A. Genetics of drug resistance tuberculosis. **Clin. Chest Med.**, v.18, n.1, p.55-64, 1997.

TELENTI, A.; PHILIPP, W. J.; SREEVATSAN, S. et al. The emb operon, a unique gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. **Nature Med.**, v.3, p.567-570, 1997.

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

TENOVER, F.C.; Crawford, J.T.; HUEBNER, R.E.; GEITER, L.J.; HORSBURGH, C.R J.R.; GOOD, R.C. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.4, p.767-770, 1993.

THIERRY, D.; BRISSON-NOËL, A.; VINCENT-LÉVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J.L.; GICQUEL, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, n.12, p.2668-2673, 1990.

TORTOLI, E.; CHIANURA, L.; FABBRO, L.; MARIOTTINI, A.; MARTÍN-CASABONA, N.; MAZZARELLI, G.; RUSSO, C.; SPINELLI, M. Infections due to the newly described species *Mycobacterium parascrofulaceum*. **J. Clin. Microbiol.**, v.8, p.4286-4287, 2005.

TRACEVSKA, T.; JANSONE, I.; NODIEVA, A.; MARGA, O.; SKENDERS, G.; BAUMANIS, V. Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Res. Microbiol.**, v.155, n.10, p.830-834, 2004.

TUDÓ, G.; REY, E.; BORRELL, S.; ALCAIDE, F.; CODINA, G.; COLL, P.; MARTÍN-CASABONA, N.; MONTEMAYOR, M.; MOURE, R.; ORCAU, A.; SALVADÓ, M.; VICENTE, E.; GONZÁLEZ-MARTÍN, J. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.65, n.11, p.2341-2346, 2010.

UMESIRI, F.E.; SANKI, A.K.; BOUCAU, J.; RONNING, D. R.; SUCHECK, S.J. Recent advances toward the inhibition of mAG and LAM synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Med. Res. Rev.**, v.30, n.2, p.290-326, 2010.

VALIM, A. R.; 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.**, v.38, p.3119–3122, 2000.

VARELDZIS, B. P.; GROSSET, J.; KANTOR, I. et al. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. **Tubercle Lung Dis.**, v.75, p.1–7, 1994.

VIANA-NIERO, C.; RODRIGUEZ, C.A.; BIGI, F.; ZANINI, M.S.; FERREIRA-NETO, J.S.; CATALDI, A.; LEÃO, S.C. Identification of an *IS6110* insertion site in *plcD*, the unique phospholipase C gene of *Mycobacterium bovis*. **J. Med. Microbiol.**, v.55, part 4, p.451-457, 2006.

VIDAL-AROCA, F.; MENG, A.; MINZ, T.; PAGE, M.G.P.; DREIER, J. Use of resazurin to detect mefloquine as an efflux-pump inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Methods**, v.79, p.232-237, 2009.

WADE, K.A.; POUNDER, J.I.; CLOUD, J.L.; WOODS, G.L. Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed Sputum for testing by quantitative Real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.5, p.2461-2473, 2005.

WHO - World Health Organization. Anti-tuberculosis drug-resistance in the world. WHO Report, 2008. Disponível em: theunion.org/download/ta/drs_report4_26feb08.pdf. Acesso em: 15-09-10.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data - Global tuberculosis Control: a short update to the report, 2009. Disponível em:

http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/en/index.html.

Acesso em: 15-09-10.

WILLIAMS, D.L.; SPRING, L.; COLLINS, L.; MILLER, L.P.; HEIFETS, L.B.; GANGADHARAM, P.R.J. et al. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, p.1853-1857, 1998.

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

WINDER, F. Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of mycobacteria. In: RATLEDGE, C; STANFORD, J. (Ed.). **The biology of mycobacteria**. New York: Academic Press. p.354-438, 1982.

WU, X.Q.; LU, Y.; ZHANG, J.X.; LIANG, J.Q.; ZHANG, G.Y.; LI, H.M.; LÜ, C.H.; DING, B.C. Detection of streptomycin resistance in mycobacterium tuberculosis clinical isolates using four molecular methods in China. **Yi Chuan Xue Bao.**, v.33, n.7, p.655-663, 2006.

XIE, T.; HO, S.L.; MA, O.C.K. High resolution SSCP analysis using formamide and ethidium bromide staining. **Mol. Pathol.**, v.50, p.276-278, 1997.

YUEN, L.K.; ROSS, B. C.; JACKSON, K. M.; DWYER, B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.6, p.1615-1618, 1993.

ZEIG, M.H, CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation in clinical medicine. **Clin. Chem.**, v.39, n.4, p.561-577, 1993.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Ann Rev Pharmacol. Toxicol.**, v.45, p.529-564, 2005.

ZHANG, Y.; AMZEL, L.M. Tuberculosis drug targets. **Curr drug targets**, v.3, p.131-54, 2002.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B. et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v.358, p.591–593, 1992.

ZHANG, Y.; TELENTI, A. Molecular genetics of mycobacteria. In: HATFULL, falta prenome; JACOBS, falta prenome (Ed.) Molecular genetics of mycobacteria. Local: ASM Press, 2000.

ZHANG, Y.; YEW, W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis**, v.13, n.11, p.1320–1330, 2009.

ZHANG, Y.; YOUNG, D. Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.34, n.3, p.313–319, 1994.

9. APÊNDICES

Apêndice I.a) Resultados de resistência de *M. tuberculosis* frente aos fármacos INH e RMP pelo sistema BACTEC™ e pelo REMA dos 85 isolados e presença ou ausência de mutação pelo PCR-SSCP

Lab	INH			RIF		
	BACTEC	REMA	SSCP	BACTEC	REMA	SSCP
1	S	0,0625		S	0,03	
7	R	1	----	R	≤0,03	
15	R	>1	<i>katG</i>	S	0,0625	
16	S	0,03-0,0625		S	0,03	
20	R	>1	----	R	≤0,03	
22	S	0,0625		S	0,015	
31	R	>1	<i>katG; ahpC</i>	S	0,03	
34	R	0,5	----	R	0,0625	
35	S	0,5--1		S	0,0625-0,125	
38	S	0,5		S	0,125	
40	S	0,0625		S	0,015	
44	S	0,0625		S	0,015	

45	R	≥1,0	----	45	S	0,015	
46	R	> 25	katG	46	R	1	----
48	S	0,0625		48	S	0,015	
50	S	0,03		50	S	0,015	
55	R	25	katG	55	R	> 25	rpoB
56	R	25	inhA; katG	56	R	12,5	rpoB
59	R	> 1	katG	59	R	1	rpoB
61	R	25	katG; ahpC	61	R	>2	----
63	R	≥1,0	katG	63	R	≤0,03	
65	S	0,0625		65	S	0,0625	
66	S	0,0625		66	S	0,0625	
67	S	≥1,0	----	67	S	0,03	
68	S	0,0625		68	S	0,015	
69	S	≥1,0	----	69	S	0,125	
71	S	0,0625		71	S	0,03	
72	S	0,0625		72	S	0,03	
74	R	25	katG	74	R	> 25	rpoB
75	S	0,03		75	S	0,03	
76	R	12,5	katG	76	R	> 25	rpoB
77	R	≥1,0	katG	77	S	0,03	
78	R	≥1,0	----	78	R	2	----

79	R	>1	----	79	R	≤0,03	
80	R	≥1,0	<i>inhA</i>	80	R	≥2,0	<i>rpoB</i>
81	R	6,25	<i>katG</i>	81	R	6,25	<i>rpoB</i>
82	R	>1	<i>inhA</i>	82	R	≤0,015	
84	R	25	<i>katG</i>	84	R	> 25	<i>rpoB</i>
85	R	≥1,0	<i>katG</i>	85	R	2	----
87	S	≥1,0	----	87	S	0,5	<i>rpoB</i>
92	R	≥1,0	<i>katG</i>	92	R	≥2,0	<i>rpoB</i>
93	R	250	----	93	R	125-250	<i>rpoB</i>
97	R	≥1,0	<i>katG</i>	97	R	≥2,0	----
98	S	0,03		98	R	250	----
100	S	≥1,0	----	100	S	0,25	----
102	S	≤0,015		102	S	≤0,03	
104	R	3,13-6,25	<i>katG</i>	104	R	25	<i>rpoB</i>
105	R	≥1,0	----	105	R	25	<i>rpoB</i>
106	R	≥1,0	<i>katG</i>	106	R	≥2,0	<i>rpoB</i>
108	R	0,5	<i>ahpC</i>	108	R	0,06	
109	S	≥1,0	----	109	S	0,125	
110	R	≥1,0	<i>katG</i>	110	R	≥2,0	----
114	R	≥1,0	----	114	R	0,125	<i>rpoB</i>
138	R	≥1,0	<i>katG</i>	138	R	≥2,0	

142	R	> 1	<i>inhA</i>	142	R	2	----
145	R	≥1,0	<i>katG</i>	145	R	≥2,0	----
147	R	1	----	147	S	0,0625	
150	R	≥1,0	<i>inhA</i>	150	S	0,125	
152	R	≥1,0	<i>inhA</i>	152	R	≥2,0	<i>rpoB</i>
158	R	≥1,0	<i>katG</i>	158	R	≥2,0	<i>rpoB</i>
159	R	≥1,0	----	159	R	0,03	
161	R	1	<i>inhA</i>	161	R	2	<i>rpoB</i>
162	R	> 1	<i>katG</i>	162	R	> 2	<i>rpoB</i>
163	R	0,5	----	163	R	0,015	
165	R	> 1	<i>katG</i>	165	R	> 2	----
167	R	> 1	<i>katG</i>	167	S	0,03	
168	R	> 1	<i>katG</i>	168	S	> 2	----
169	R	> 1	<i>inhA</i>	169	R	> 2	----
171	R	> 1	<i>inhA</i>	171	R	> 2	<i>rpoB</i>
172	R	1	<i>inhA</i>	172	R	2	<i>rpoB</i>
173	R	> 1	<i>ahpC</i>	173	R	> 2	<i>rpoB</i>
174	R	> 1	<i>katG</i>	174	R	> 2	----
175	R	> 1	<i>katG</i>	175	R	> 2	----
176	R	> 1	<i>inhA</i>	176	R	1	----
178	R	> 1	<i>katG</i>	178	R	> 2	----

180	R	> 1	<i>katG</i>	R	> 2	<i>rpoB</i>
181	S	0,0625		S	≤0,03	
182	R	0,0625	----	R	1	<i>rpoB</i>
184	R	≥1,0	<i>inhA</i>	S	0,125	
185	R	> 1	<i>inhA</i>	R	> 2	<i>rpoB</i>

Apêndice I.b) Resultados de resistência de *M. tuberculosis* frente aos fármacos STR e ETB pelo sistema BACTEC™ e pelo REMA dos 85 isolados e presença ou ausência de mutação pelo PCR-SSCP

Lab	STR			ETB		
	BACTEC	REMA	SSCP	BACTEC	REMA	SSCP
1	S	0,25	----	S	8--16	----
7	S	1	----	S	2	
15	S	0,0625		S	4	
16	S	0,25		S	> 64	----
20	S	0,25		S	8	
22	S	0,25		S	2	
31	R	1	----	S	> 16	----
34	R	1	rpsL	S	8	
35	S	1		S	2--4	
38	S	2	rpsL	S	4	
40	S	0,25		S	4	
44	S	0,25		S	8	
45	S	0,25		S	≥32	----
46	R	1	----	S	4	
48	S	0,25		S	16	----
50	S	0,125		S	> 16	----

55	R	1	----	----	----
56	S	2			
59	S	0,5	----	----	----
61	R	1	----	----	----
63	S	≥8,0	----	----	----
65	R	> 4	rpsL	----	----
66	S	0,25			
67	S	0,25			
68	S	0,125			
69	S	0,25			
71	S	0,25			
72	S	0,25			
74	S	≤0,125			
75	S	0,25			
76	S	0,25			
77	S	0,25			
78	R	≥4,0	----	----	----
79	R	0,25	----	----	----
80	S	≤0,125			
81	R	4	----	----	----
55	R	> 16			----
56	R	16			----
59	R	> 16			----
61	R	> 64			----
63	R	≥32			----
65	S	> 16			----
66	S	> 16			----
67	S	8			
68	S	16			----
69	S	≥16			----
71	S	8			
72	S	8			
74	R	≤0,5			
75	S	16			----
76	R	4			----
77	S	≥16			----
78	S	≥16			----
79	S	8			
80	S	4			
81	S	≥16			----

82	S	4	----	----	R	> 16	----
84	S	0,5	----	----	S	4	----
85	R	0,25			R	1	----
87	S	≥8,0	----	----	S	8	----
92	R	1	rpsL	----	S	≥32	----
93	R	0,25	----	----	S	≥16	----
97	R	2			R	2	----
98	S	0,125			S	2	
100	S	0,25			S	≥32	----
102	S	≤0,125			S	2	
104	R	4	----	----	R	≥32	----
105	R	4	----	----	S	≥32	----
106	R	2	----	----	R	≥16	----
108	S	1	----	----	S	1	
109	S	1	rpsL	----	S	1	
110	R	1	----	----	R	32	----
114	S	0,5	----	----	S	≥16	----
138	R	0,5	----	----	R	≥16	
142	R	2	----	----	S	> 16	----
145	S	0,25			S	8	

147	S	1	rpsL	----	147	S	4	----
150	R	2	rpsL	----	150	S	4	----
152	S	0,5	----	----	152	S	≥16	----
158	S	0,25			158	S	≥16	----
159	S	0,25			159	S	≥16	----
161	R	0,5	----	----	161	S	16	----
162	ctd	0,5	----	----	162	R	> 16	----
163	R	0,125			163	R	1	----
165	R	> 4	rpsL	----	165	R	> 16	----
167	S	0,125			167	S	4	
168	S	0,25			168	S	> 16	----
169	R	0,5	----	----	169	R	> 16	----
171	R	> 4	----	----	171	R	> 16	----
172	R	1	----	----	172	R	16	----
173	S	0,25			173	S	> 16	----
174	R	4	----	----	174	S	> 16	----
175	S	0,125			175	S	2	
176	S	2	----	----	176	S	> 16	----
178	S	0,0625			178	S	1	
180	S	0,25			180	S	> 16	----

181	R	1	----	----
182	S	$\leq 0,625$		
184	S	0,5	----	
185	R	> 4	----	----

181	S	≥ 16		----
182	S	1		
184	S	≥ 16		----
185	R	> 16		----

CAPÍTULO II

***Rhodococcus equi* isolation from sputum of patients with suspected tuberculosis**

Paulo da Silva^{1,2}, Marcelo Miyata¹, Daisy Nakamura Sato², Adolfo Carlos Barreto Santos¹, Natália Helena Mendes¹, Clarice Queico Fujimura Leite^{1/+}

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil ²Laboratório de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Rhodococcus equi has emerged as an opportunistic pathogen associated with pulmonary, invasive or systemic infections in immunocompromised patients. We report the identification of 51 *R. equi* isolates found in sputum samples of 546 individuals suspected to have pulmonary tuberculosis in two Public Health Hospital Units in Brazil. The epidemiology of *R. equi* infection as well as the phenotypic identification and drug susceptibility profile of isolates are described in this paper.

Key words: *Rhodococcus equi* - identification - tuberculosis - antimicrobial profile - epidemiology

The genus *Rhodococcus* belongs to the group of nocardiform, Gram-positive rods containing mycolic acids in the cell wall; this group also includes the genera *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Millisia*, *Segniliparus*, *Skermania*, *Tsakamurella* and *Williamsia* (Soddell et al. 2006a, b, Tsitko et al. 2006). The genus *Rhodococcus* was discovered by Zopf in 1891 (Goodfellow & Alderson 1977) and comprises 30 species, of which *Rhodococcus equi* is considered the most opportunistic pathogen in mammals, including humans (Meijer & Prescott 2004). The first case of human infection was reported in 1967 in a patient presenting with a pulmonary abscess. The two first cases that occurred in Brazil were reported by Severo et al. (2001). However, with the AIDS epidemic, the number of patients infected by *R. equi* has grown (Roda et al. 2009). *R. equi* also causes infection in patients with lymphoma, chronic renal failure, alcoholism, lung cancer, leukaemia, diabetes mellitus and other immunodeficient syndromes. Some cases have been reported in which the infection can also occur in immunocompetent hosts (von Bargen & Haas 2009).

When incubated aerobically at 37°C, *R. equi* grows efficiently in the majority of nonselective culture media, including media used in mycobacteria isolation and produces irregular, smooth and mucoid colonies that turn a shade of salmon pink to yellow after a week of growth (Prescott 1991). *R. equi* appears coccoid on stained smears of clinical specimens, especially purulent material and tissue (obtained by biopsy, during surgery and upon autopsy). However, long rods have been reported in clinical specimens isolated from blood, sputum and bronchial lavage fluid (von Bargen & Haas 2009). Colony morphology and acid-fast staining are characteristic fea-

tures in the initial identification of different nocardioform genera (Christopher & Bruno 2002). In general, *R. equi* is biochemically non-reactive, has no proteolytic activity and fails to oxidize or ferment carbohydrates, with the exception of glucose, which is oxidized by *R. equi* in 14 days. *R. equi* is strictly aerobic, catalase positive, oxidase negative and mostly urease positive. *R. equi* produces soluble “*equi* factors” that are associated with phospholipase and cholesterol oxidase activity and interact with phospholipase D of *Listeria ivanovii* to induce complete haemolysis of sheep erythrocytes (Prescott 1991).

The Laboratory of Mycobacteriology at the Adolfo Lutz Institute in Ribeirão Preto (SP, Brazil) has frequently isolated partial acid-fast bacteria from sputum of patients suspected to have pulmonary tuberculosis. Considering the emerging clinical importance of *R. equi*, our goal was to identify the 51 partial acid-fast bacteria isolated from sputum, to determine the antimicrobial profiles of these isolates and to analyse the epidemiological characteristics of patients with *R. equi* infection.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Clinical samples - Sputum samples (duplicates/triplicates) were obtained from 546 patients suspected to have pulmonary tuberculosis in Public Health Hospital Units in Ribeirão Preto and the surrounding region. The samples were analysed by the Laboratory of Mycobacteriology at the Adolfo Lutz Institute in Ribeirão Preto.

***R. equi* isolation and identification** - After testing for acid-fast bacilli (AFB), samples from 296 patients showed the presence of AFB; in 60 patients, partial AFB or coccobacilli, suggestive of *Rhodococcus* spp, were isolated. The AFB samples were cultured using the automated MB/BacT system (bioMérieux) and subjected to mycobacteria identification by phenotypic methods and Accuprobe® (GenProbe). The 60 AFPB were cultured on Müller Hinton agar (MH) plates and using the automated MB/BacT system (bioMérieux) to verify the absence of *Mycobacterium* spp. Isolated colonies were transferred to MH agar slants in tubes. The identifica-

Financial support: FAPESP, CNPq
+ Corresponding author: leiteccqf@fcfar.unesp.br
Received 20 October 2009
Accepted 25 February 2010

tion of *R. equi* was based on microscopic observation of bacteria subjected to Gram's and Ziehl-Neelsen staining (Ballows et al. 1991) and phenotypic biochemical tests described in the Manual of Systematic and Clinic Microbiology (Ballows et al. 1991, Holt et al. 1994, Murray et al. 1999, Koneman et al. 2000, Mac Faddin 2000). Gordon's base culture medium was used for acid production in carbohydrate tests (McNeil & Brown 1994). The CAMP test was performed as described by Bille and Doyle (1991), using *L. ivanovii* ATCC 19119 and *R. equi* ATCC 6939 as standard strains.

Susceptibility tests - The disk-diffusion method was performed as recommended in the Clinical and Laboratory Standard Institute/National Committee and Clinical Laboratory Standards guidelines. In this method, 28 antimicrobial agents were used (results of *Staphylococcus* sp. were used as the basis for data interpretation) (CLSI/NCCLS 2004) and *R. equi* ATCC 6939, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 served as the reference strains.

Epidemiological investigation - The available patient data, such as gender, age and immunosuppressive condition, were utilized for epidemiological investigation.

RESULTS

Sixty patient samples out of a total of 546 patients had evidence of *Rhodococcus* spp isolates and among these, 51 were identified as *R. equi* based on the results of the phenotypic tests presented in Table I. All of the 51 isolates were catalase positive, oxidase negative and failed to oxidize or to ferment carbohydrates or alcohols. These isolates produced *equi* factors (CAMP test) and lipase but not gelatinase, esculinase, H₂S or indole and they did not use citrate or malonate. For nitrate reductase, urease and hippurate reduction, the 51 isolates showed variable results. There was 100% similarity between the 51 isolates and *R. equi* ATCC 6939, the standard strain. Nine isolates could not be identified as *R. equi* because the CAMP test was negative, despite the similarity of results in all other tests and in comparison to the standard strain.

The analysis of epidemiological data showed that, from a total of 51 patients infected by *R. equi*, 37 (72.5%) were male and 14 (27.4%) were female. The age range most affected was between 31-50 years, comprising 60.8% of patients. There were no cases of childhood infection. The youngest patient was 17 years old and the oldest was 69 years old (Figure). All patients showed some degree of immunosuppression, such as through infection with HIV, chronic alcoholism, drug use or transplant surgery.

Twenty-eight antimicrobial agents were tested against the 51 *R. equi* isolates by the disk-diffusion method. The sensitivity profile can be seen in Table II. The aminoglycosides (amikacin and gentamicin), the tetracycline (minocycline) and the glycopeptides (teicoplanin and vancomycin) were 100% effective. The macrolides (azithromycin and clarithromycin) were also 100% effective, with the exception of erythromycin, for which one isolate showed intermediate sensitivity (98.04% effective). The β -lactam agents alone showed poor activity (49.02% for cefoxitin, 45.10% for cefepime, 23.53% for cefotaxime, 19.60% for

TABLE I
Phenotypic identification of *Rhodococcus equi*

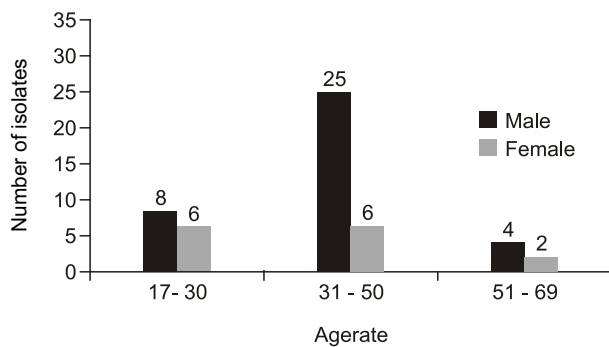
Phenotypic characteristics of <i>R. equi</i>	Phenotypic characteristics of 51 isolates		
	Reaction ^a %	Positives n	Result %
Catalase	100 (+)	51	100 (+)
Oxidase	1-5 (+)	0	100 (-)
Motility	100 (-)	0	100 (-)
Obligate aerobe	100 (+)	51	100 (+)
Glucose fermentation	100 (-)	0	100 (-)
Glucose oxidation	100 (+)	51	100 (+)
Sole carbon source ^b	100 (-)	0	100 (-)
<i>equi</i> factor (CAMP test)	100 (+)	51	100 (+)
Gelatinase	100 (-)	0	100 (-)
Indol	100 (-)	0	100 (-)
H ₂ S	32 (+)	0	100 (-)
Urease	95 (+)	45	88 (+)
Nitrate reduction	88 (+)	50	98 (+)
Lipase	100 (+)	51	100 (+)
DNase	100 (-)	0	100 (-)
Lecithinase	100 (-)	0	100 (-)
Hippurate hydrolysis	1 (+)	06	88 (-)
Esculin hydrolysis	4 (+)	0	100 (-)
Adenine hydrolysis	100 (+)	51	100 (+)
Casein hydrolysis	100 (-)	0	100 (-)
Hypoxanthine hydrolysis	100 (-)	0	100 (-)
Tyrosine hydrolysis	100 (-)	0	100 (-)
Xanthine hydrolysis	100 (-)	0	100 (-)

a: adapted from Prescott 1991, McNeil and Brown 1994 and Christopher and Bruno 2002; *b*: all isolates failed to use acetate, citrate or malonate as sole carbon source, or produce acid from adonitol, arabinose, cellobiose, erythritol, fructose, galactose, glycerol, inositol, maltose, mannitol, mannose, melibiose, raffinose, rhamnose, sucrose, salicin, sorbitol, starch and xylose; +: positive reaction; -: negative reaction.

cephalothin, 13.73% for cefazolin, 7.84% for ampicillin, 5.88% for penicillin and 1.96% for oxacillin) but when associated with a β -lactamase inhibitor, the activity rose significantly (98.04% for amoxicillin and clavulanate). Imipenem (98.04%) and ceftriaxone (80.39%) were the most effective β -lactam agents. Other antimicrobial agents that showed low activity were clindamycin and sulfamethoxazole + thrimethoprim, in which 90.20% and 58.84% of the strains were resistant, respectively. The quinolones, levofloxacin (96.08%), ciprofloxacin (92.16%) and norfloxacin (90.20%), were very effective, as were rifampin (98.04%), doxycycline (96%), chloramphenicol (84.31%) and tetracycline (78.43%).

DISCUSSION

Among the 546 sputum samples from individuals suspected to have pulmonary tuberculosis, it was found that 406 patient samples effectively gave acid-fast or partial acid-fast positive results. *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria were isolated



Age and sex distribution of 51 isolates phenotypically characterized as *Rhodococcus equi* from sputum.

from 67.5% (274/406) and 17.7% (72/406) of the patients, respectively. *R. equi* was identified as the single agent in 12.6% (51/406) of patients. Another nine isolates (2.2%) gave negative CAMP test results and were considered only to be *Rhodococcus* spp, although these isolates showed similar results as the standard strain in all other biochemical tests. According to Bille and Doyle (1991) and Prescott (1991), *R. equi* isolates with a negative *equi* factor have been described. In spite of the general consensus that human infections with *R. equi* are rare, our results indicated that infection is not so infrequent. Corti et al. (2009) and Martin et al. (2007) suggested that in patients with *M. tuberculosis*/HIV co-infection, respiratory pathogens such as *R. equi* should also be considered. Due to the similarity of the clinical symptoms of rhodococcosis and tuberculosis (Tsitko et al. 2006), as well as the high prevalence of tuberculosis in the population and the partial acid-fastness of *R. equi*, a mistaken diagnosis can easily be made in the laboratory and in medical practice.

The epidemiological data analysis showed that *R. equi* was isolated four times more often in male patients, whose predominant (60.8%) age range was from 31-50 years. A male predominance of 3:1 for pulmonary rhodococcosis was also observed by Kedlaya et al. (2001). HIV infection is one of the main factors predisposing patients to *R. equi* infection (Roda et al. 2009) and normally, the incidence of HIV is higher among males, which explains the predominance of *R. equi* strains in males. In our study, all 51 patients infected with *R. equi* were also co-infected with HIV. Torres-Tortosa et al. (2003) assessed *R. equi* infection in 67 patients co-infected with HIV. Fifty-five patients were male with ages varying between 25-37 years. These authors also found that most (52.2%) of these bacterial isolates came from sputum.

Treatment of *R. equi* infection must be based on the results of antimicrobial susceptibility tests because there is no standard drug regimen for *R. equi* infection in humans (Roda et al. 2009) and the emergence of some strains resistant to various antibiotics has been reported within the last 10 years (Buckley et al. 2007). *R. equi* isolates in our study showed resistance to β -lactam agents, in agreement with the results described by Roda et al. (2009). When β -lactam agents were combined with a

TABLE II
Susceptibility test results in disk-diffusion test with 28 antimicrobial agents against 51 *Rhodococcus equi* isolates^a

Antimicrobial agents (concentration)	Isolates/isolates tested n (%)		
	Sensitive	Intermediate	Resistant
Aminoglycosides			
AMI (30 μ g)	51 (100)	-	-
GEN (10 μ g)	51 (100)	-	-
β-lactams			
AMC (30 μ g)	50 (98)	-	01 (20)
AMP (10 μ g)	04 (7.8)	-	47 (92.2)
CFL (30 μ g)	10 (19.6)	01 (2)	40 (78.4)
CFZ (30 μ g)	07 (13.7)	01 (2)	43 (84.3)
CRO (30 μ g)	41 (80.4)	03 (5.9)	07 (13.7)
CFO (30 μ g)	25 (49)	11 (21.6)	15 (29.4)
CTX (30 μ g)	12 (23.5)	01 (2)	38 (74.5)
CPM (30 μ g)	23 (45.1)	06 (11.8)	22 (43.1)
IPM (10 μ g)	50 (98)	-	01 (2)
OXA (5 μ g)	01 (2)	-	50 (98)
PEN (10UI)	03 (5.9)	-	48 (94.1)
Chloramphenicol			
CLO (30 μ g)	43 (84.3)	02 (4)	06 (11.7)
Glycopeptides			
TEC (30 μ g)	51 (100)	-	-
VAN (30 μ g)	51 (100)	-	-
Lincosamide			
CLI (2 μ g)	01 (2)	04 (7.8)	46 (90.2)
Macrolides			
AZI (15 μ g)	51 (100)	-	-
CLA (15 μ g)	51 (100)	-	-
ERI (15 μ g)	50 (98)	01 (2)	-
Quinolones			
CIP (5 μ g)	47 (92.1)	03 (5.9)	01 (20)
LVX (5 μ g)	49 (96)	01 (2)	01 (2)
NOR (10 μ g)	46 (90.2)	01 (2)	04 (7.8)
Rifampin	-	-	-
RIF (5 μ g)	50 (98)	-	01 (2)
Sulfa + trimethoprim			
SMT (25 μ g)	21 (41.2)	-	30 (58.8)
Tetracyclines			
TET (30 μ g)	40 (78.4)	08 (15.7)	03 (5.9)
DOX (30 μ g)	49 (96)	01 (2)	01 (2)
MIN (30 μ g)	51 (100)	-	-

^a: the Interpretative Patterns of Halo Inhibition Diameters were those determined for *Staphylococcus* sp., in agreement with Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Fifteenth Informational Supplement, document M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9. 2005); AMC: amoxicillin + clavulanate; AMI: amikacin; AMP: ampicillin; AZI: azithromycin; CFL: cephalothin; CFO: ceftiofloxacin; CFZ: cefazolin; CIP: ciprofloxacin; CLA: clarithromycin; CLI: clindamycin; CLO: chloramphenicol; CPM: cefepime; CRO: ceftriaxone; CTX: cefotaxime; DOX: doxycycline; ERI: erythromycin; GEN: gentamicin; IPM: imipenem; LVX: levofloxacin; MIN: minocycline; NOR: norfloxacin; OXA: oxacillin; PEN: penicillin G; RIF: rifampin; SMT: sulfamethoxazole + Trimethoprim; TEC: teicoplanin; TET: tetracycline; VAN: vancomycin.

beta-lactamase inhibitor, the activity was significantly increased (98.04% for amoxicillin-clavulanate), confirming the correlation of β -lactamase enzyme production and resistance.

Because *R. equi* is an intracellular bacteria, the infection can be treated with macrolides, such as erythromycin and rifampicin (Heidmann et al. 2006, Buckley et al. 2007). The macrolides tested in our study, azithromycin and clarithromycin, were 100% effective, while erythromycin was 98% effective against the *R. equi* isolates. The quinolones were very effective against *R. equi*, with sensitivity similar to that against *M. tuberculosis* clinical isolates (Ginsburg et al. 2003). Rifampin, a first-line drug for tuberculosis control, was also effective in 98.04% of isolates. Torres-Tortosa et al. (2003) reported that in 55 patients infected with *R. equi*, the most effective antibiotics were vancomycin, amikacin, rifampin, imipenem, ciprofloxacin and erythromycin. The effectiveness of these antibiotics was confirmed in our 51 isolates.

R. equi infection in humans is an underidentified disease and can be confused with tuberculosis or other granulomatous pathologies. Our intention is to alert health professionals about the importance of investigating suspected pulmonary pathologies for potential *R. equi* infection, especially in immunocompromised patients with cavitory lesions.

REFERENCES

- Balows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ 1991. *Manual of clinical microbiology*, 5th ed., ASM Press, Washington DC, 1364 pp.
- Bille J, Doyle MP 1991. Listeria and Erysipelothrix. In A Balows, WJ Hausler Jr, KL Herrmann, HD Isenberg, HJ Shadomy, *Manual of clinical microbiology*, 5th ed., ASM Press, Washington DC, p. 287-295.
- Buckley T, McManamon E, Stanbridge S 2007. Resistance studies of erythromycin and rifampin for *Rhodococcus equi* over a 10-year period. *Ir Vet J* 60: 728-731.
- Christopher K, Bruno E 2002. *Tested studies for laboratory teaching*. Association for Biology Laboratory Education, Louisiana State University 24, p. 103-130.
- CLSI/NCCLS - Clinical and Laboratory Standard Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards 2004. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Fourteenth Informational Supplement. Approved standard M100-S14*, NCCLS, Wayne, 177 pp.
- Corti M, Palmero D, Eiguchi K 2009. Respiratory infections in immunocompromised patients. *Curr Opin Pulm Med* 15: 209-217.
- Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR 2003. Fluoroquinolones, tuberculosis and resistance. *Lancet Infect Dis* 3: 432-442.
- Goodfellow M, Alderson G 1977. The Actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the 'rhodochrous' complex. *J Gen Microbiol* 100: 99-122.
- Heidmann P, Madigan JE, Watson JL 2006. *Rhodococcus equi* pneumonia: clinical findings. Diagnosis. Treatment and prevention. *Clin Tech Equine Pract* 5: 203-210.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, A Waverly Company, Baltimore, 787 pp.
- Kedlaya I, Ing MB, Wong S 2001. *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. *Clin Infect Dis* 32: 39-47.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC 2001. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*, 5th, Editora Médica e Científica, 1465 pp.
- Martin A, Uwizeye C, Fissette K, De Rijk P, Palomino JC, Leão S, Portals F 2007. Application of the *hsp65* PRA method for the rapid identification of mycobacteria isolated from clinical samples in Belgium. *J Microbiol Methods* 71: 39-43.
- Mc Faddin JF 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3th ed., Williams & Wilkins, Baltimore MD, 901 pp.
- McNeil MM, Brown JM 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 7: 357-417.
- Meijer WG, Prescott JF 2004. *Rhodococcus equi*. *Vet Res* 35: 383-396.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover HR 1999. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed., ASM Press, Washington DC, p. 1526-1543.
- Prescott JF 1991. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 4: 20-34.
- Roda RH, Young M, Timpone J, Rosen J 2009. *Rhodococcus equi* pulmonary-central nervous system syndrome: brain abscess in a patient on high-dose steroids - a case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63: 96-99.
- Severo LC, Ritter P, Petrillo VF, Dias CAG, Porto NS 2001. Infecção pulmonar por "*Rhodococcus equi*": relato dos dois primeiros casos brasileiros. *J Pneumol* 27: 158-162.
- Soddell JA, Stainsby FM, Eales KL, Kroppenstedt RM, Seviour RJ, Goodfellow M 2006a. *Millisia brevis* gen. nov. sp. nov. an actinomycete isolated from activated sludge foam. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 739-744.
- Soddell JA, Stainsby FM, Eales KL, Seviour RJ, Goodfellow M 2006b. *Gordonia defluvii* sp. nov. an actinomycete isolated from activated sludge foam. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2265-2269.
- Torres-Tortosa M, Arrizabalaga J, Villanueva JL, Gálvez J, Leyes M, Valencia ME, Flores J, Peña JM, Pérez-Cecilia E, Quereda C 2003. Prognosis and clinical evaluation of infection caused by *Rhodococcus equi* in HIV-infected patients: a multicenter study of 67 cases. *Chest* 123: 1970-1976.
- Tsitko I, Rahkila R, Priha O, Ali-Vehmas T, Terefework Z, Soini H, Salkinoja-Salonen MS 2006. Isolation and automated ribotyping of *Mycobacterium lentiflavum* from drinking water distribution system and clinical specimens. *FEMS Microbiol Lett* 256: 236-243.
- von Bargen K, Haas A 2009. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiol Rev* 33: 870-891.

1 **Assessment of the quality of DNA extracted by two techniques from**
2 ***Mycobacterium tuberculosis* for fast molecular identification and genotyping**

3

4 **Marcelo Miyata^{1*}; Adolfo Carlos Barreto Santos¹; Natália Helena Mendes¹;**
5 **Eunice Atsuko Cunha²; Fernando Augusto Fiúza de Melo³; Clarice Queico**
6 **Fujimura Leite¹**

7

8 1. São Paulo State University - UNESP - School of Pharmaceutical Sciences -
9 Araraquara - SP

10 2. LACEN - Campo Grande - MS

11 3. Clemente Ferreira Institute - São Paulo - SP

12 *Corresponding author: marcelo_miyatabr@yahoo.com.br

13

14 **ABSTRACT**

15 We report a comparative study of two DNA extraction techniques, thermolysis
16 and chemical lysis (CTAB), for molecular identification and genotyping of *M.*
17 *tuberculosis*. Forty DNA samples were subjected to PCR and the results demonstrated
18 that with thermolysis it is possible to obtain useful data that enables fast identification
19 and genotyping.

20 **Key words:** DNA extraction - *Mycobacterium tuberculosis* - thermolysis - CTAB

21

22 Tuberculosis (TB) is responsible for the death of approximately 3 million people
23 per year and it is estimated that one third of the human population is infected latently
24 with *Mycobacterium tuberculosis*, Brazil occupying 16th place in the world ranking (13).

1 The development of fast molecular biology techniques to identify and genotype *M.*
2 *tuberculosis* isolates is crucial for the prevention and control of tuberculosis. Although
3 techniques based on amplification of nucleic acids are highly sensitive and reduce the
4 time required for identification or epidemiological study of *M. tuberculosis*, there are
5 few studies assessing the quality of *M. tuberculosis* DNA extracted from cultures.
6 Several techniques for DNA extraction have been described (6, 9), for application in
7 distinct diagnostic methods.

8 Here we aimed to find a fast and easy method to extract DNA of sufficiently
9 high quality to be used in the molecular identification and genotyping of *M.*
10 *tuberculosis* isolates. Two methods for DNA extraction from *M. tuberculosis* cultures
11 were compared and the extracted DNA was utilized for identification of the isolates by
12 PCR and their genotyping by the spoligotyping technique.

13 A total of 40 clinical isolates *M. tuberculosis* were analyzed. The first method of
14 extraction was a modified thermolysis technique (10) and the second was chemical lysis
15 with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (12). In the thermolysis method, a
16 loopful of mycobacteria grown on Lowenstein-Jensen medium was suspended in 300
17 mL of TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.5) and subjected to 3 cycles of
18 boiling and freezing for 20 minutes at -20°C. In the CTAB method, the samples were
19 inactivated by heating for 18 - 24 hours at 80°C in a dry bath. After that, proteinase K
20 and sodium dodecyl sulfate (SDS) were added and the samples incubated for 10 minutes
21 at 65°C. 5M NaCl and CTAB solution were then added and incubated for another 10
22 minutes at 65°C. Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) mixture was added and mixed
23 until a milky mixture was obtained, which was centrifuged to 11,750 rcf for 5 minutes.
24 The upper phase was transferred to a new tube containing isopropanol and the samples

1 were vortexed and frozen for 18 hours. After thawing, the samples were centrifuged for
2 30 minutes at 4°C and the supernatant was discarded. After drying, the samples were
3 washed with 70% ethanol and centrifuged for 20 minutes at 11,750 rcf at 4°C. The
4 supernatant was discarded and the pellets were dried at room temperature. The samples
5 were resuspended in TE buffer and incubated for one hour at 65°C and, finally, frozen
6 for 2 hours at -20°C.

7 For the molecular identification by PCR, a pair of universally accepted primers
8 were used to amplify a fragment of the insertion sequence IS6110 (PCR-IS6110), a
9 specific sequence for the *M. tuberculosis* complex (11). For the PCR reaction, 21.5 µL
10 of 1x PCR-Master Mix (Fermentas™, USA), 0.5 µL of each primer (INS-1 5'-
11 CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3' and INS-2 5'GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-
12 3') and 2.5 µL of genomic DNA were mixed. After this, the reaction was performed in
13 the PTC-100 Thermo cycler (MJ Research) under the following conditions: initial cycle
14 of 95°C for 10 minutes, followed for 30 cycles of 94°C for 1 minute, 56°C for 2 minutes
15 and 72°C for 1 minute and a final cycle of 72°C for 7 minutes. Subsequently, 10 µL of
16 amplified product was loaded on 1% agarose gel, resolved by electrophoresis and
17 stained with ethidium bromide.

18 Strains were genotyped by the spoligotyping technique, which is a standard
19 method for *M. tuberculosis*. Spoligotyping is a PCR-based technique that
20 simultaneously detects and types *M. tuberculosis* through patterns of multiple, well-
21 conserved 36-bp direct repeats (DRs) with nonrepetitive spacer sequences, 34 to 41 bp
22 long (5).

23 In the spoligotyping technique, two amplifications of the extracted DNA were
24 performed. In the first amplification reaction, 20 µL of 1x PCR-Master Mix

1 (Fermentas™, USA), 1 μL of each primer at 5 μM (DRa 5'biotinylated-
2 GGTTTTGGGTCTGACGAC-3', and DRb 5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3') (5)
3 and 1 μL of extracted DNA. In the second amplification reaction, PCR-amplified
4 products were used as template. The reactions were performed in a PTC-100 Thermo
5 cycler (MJ Research), with an initial cycle of 15 minutes at 95°C, followed for twenty
6 cycles of 60 seconds at 95°C, 60 seconds at 55°C and 30 seconds at 72°C and a final
7 cycle of 5 minutes at 72°C. Following DNA amplification, 20 μL of amplicons were
8 added to 150 μL of 2x SSPE/0.1% SDS solution and heated at 100°C for 10 minutes.
9 Next, 150 μL of this mixture were applied to a membrane and incubated for 60 minutes
10 at 60°C for hybridization.

11 The membrane was washed twice with 2x SSPE/0.5% SDS solution and
12 incubated in 1:4,000-diluted streptavidin-peroxidase conjugate (Zymed Laboratories,
13 USA) for 60 minutes at 42°C. Afterwards, the membrane was washed twice with 2x
14 SSPE and incubated for 1 minute with ECL™ (GE Healthcare, UK), for
15 chemoluminescence. As the DRa primer is labeled with biotin, the amplified DNA
16 could be used for hybridization to spacer nucleotides, which were covalently bound to a
17 membrane (5). After 30 minutes contact with the membrane, X-ray film was labeled and
18 the spoligopatterns were visualized. DNA from *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*
19 H₃₇Rv were used as positive controls and 2x SSPE/0.1% SDS solution as negative
20 control. The results of spoligotyping of DNA extracted by both lysis techniques were
21 analyzed comparatively, using the Fourth International Spoligotyping Database
22 (SpolDB4) (2).

23 Out of these two extraction techniques, thermolysis proved to be easier and
24 faster. In thermolysis, the DNA was extracted after 2 hours, while in chemical lysis with

1 CTAB, the extracted DNA was obtained after 30 hours. In laboratories that work with
2 pathogenic bacteria such as *M. tuberculosis*, the thermolysis technique is of special
3 interest because the cyclic procedures of heating and freezing cause the death of the
4 bacteria, preventing contamination. Several studies have demonstrated the usefulness of
5 thermolysis for inactivation and DNA extraction (8, 4).

6 In the molecular identification tests, the PCR results indicated that both
7 techniques (thermolysis and CTAB) can be used for DNA extraction, as illustrated in
8 Figures 1a and Figure 1b, respectively. Regarding genotyping by spoligotyping, it was
9 possible to obtain the spoligotypes with the DNA extracted by both techniques
10 (thermolysis and CTAB), as illustrated in Figures 2a and 2b, respectively.

11 The spoligotypes found belong to 5 families and 12 sub-families: LAM2,
12 LAM4, LAM6, LAM9, LAM3 S Convergent, H1, H3, S, T1, T4-CEU1, U Likely T3
13 and U. These results showed that the spoligotyping technique can be successfully
14 performed with DNA extracted by thermolysis, because in the molecular epidemiology,
15 the quality and the efficiency of amplification depend on the efficiency of DNA
16 extraction methods (1) and the quality of *Taq* polymerase (3).

17 In conclusion, thermolysis is a simple, fast method that can be employed in the
18 extraction of *M. tuberculosis* DNA. The quality of the DNA obtained by thermolysis
19 was sufficient to allow molecular identification by PCR and genotyping by
20 spoligotyping, contributing to the rapid diagnosis and control of tuberculosis for
21 molecular epidemiology.

22

23

24

1 **ACKNOWLEDGEMENTS**

2 This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
3 Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
4 (FAPESP).

5

1 **REFERENCES**

2 1. Amaro, A.; Duarte, E.; Amado, A.; Ferronha, H.; Botelho, A. (2008). Comparison of
3 three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*
4 and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47(1), 8-11.

5

6 2. Brudey, K.; Driscoll, J.R.; Rigouts, L. *et al.* (2006). *Mycobacterium tuberculosis*
7 complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database
8 (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 6,
9 23.

10

11 3. Cavalcanti, H.R.; Marques, E.; Fonseca L.S.; Saad, M.H.F. Do DNA extraction
12 methods and Taq polimerase quality improve the double repetitive element (DRE) PCR
13 typing method for *Mycobacterium tuberculosis* strains?. *Braz. J. Microbiol.* (2007). 38,
14 409-412.

15

16 4. Clarridge, J.E.; Shawar, R.M.; Shinnick, T.M.; Plikaytis, B.B. (1993). Large-scale
17 use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a
18 routine mycobacteriology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 31(8), 2049-56.

19

20 5. Kamerbeek, J.; Schouls, L.; Kolk, A.; van Agterveld, M.; van Soolingen, D.; Kuijper,
21 S.; Bunschoten, A.; Molhuizen, H.; Shaw, R.; Goyal, M.; van Embden, J. (1997).
22 Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for
23 diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35(4), 907-14.

24

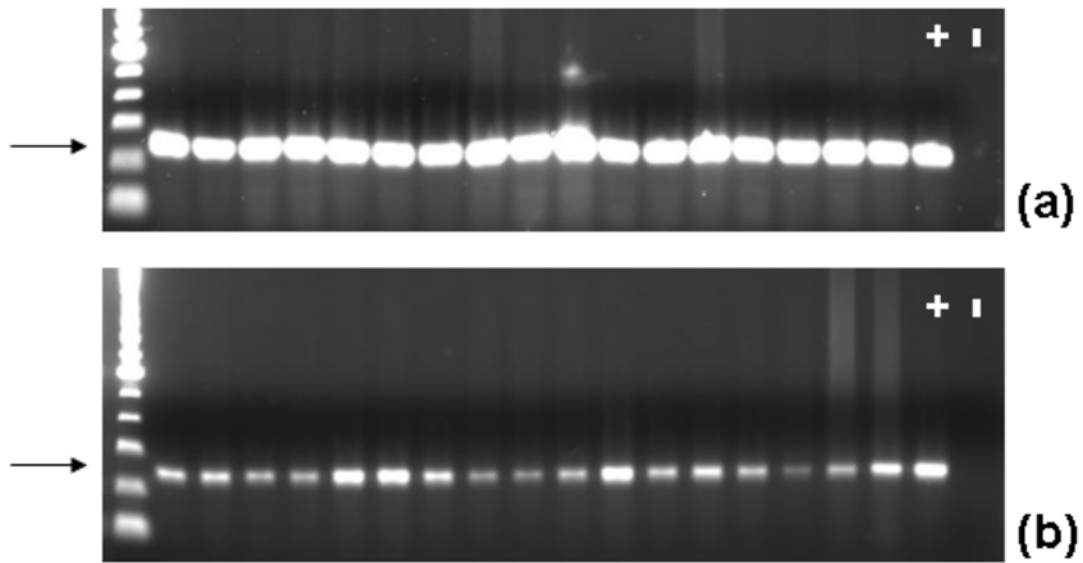
- 1 6. Lee, J.H.; Park, Y.; Choi, J.R.; Lee, E.K.; Kim, H.S. (2010). Comparisons of three
2 automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory.
3 *Yonsei Med. J.* 51(1), 104-10.
4
- 5 7. Ramazanzadeh, R.; Farnia, P.; Amirmozafari, N. (2009). Characterization of
6 *Mycobacterium tuberculosis* Complex isolated from Iranian and Afghani patients by
7 Spoligotyping method. *Braz. J. Microbiol.* 40, 314-320.
8
- 9 8. Shawar, R.M.; el-Zaatari, F.A.; Nataraj, A.; Clarridge, J.E. (1993). Detection of
10 *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using two-step PCR and nonisotopic
11 hybridization methods. *J. Clin. Microbiol.* 3, 61-65.
12
- 13 9. Tan, S.C.; Yiap, B.C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the
14 present. *J. Biomed. Biotechnol.* Article ID 574398.
15
- 16 10. Telenti, A.; Marchesi, F.; Balz, M.; Bally, F.; Böttger, E.C.; Bodmer, T. (1993).
17 Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction
18 and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31(2), 175-8.
19
- 20 11. Thierry, D.; Cave, M.D.; Eisenach, K.D.; Crawford, J.T.; Bates, J.H.; Gicquel, B.;
21 Guesdon, J.L. (1990). IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis*
22 complex. *Nucleic Acids Res.* 18(1), 188.
23

1 12. van Embden, J.D.; Cave, M.D.; Crawford, J.T.; Dale, J.W.; Eisenach, K.D.;
2 Gicquel, B.; Hermans, P.; Martin, C.; McAdam, R.; Shinnick, T.M. *et al.* (1993). Strain
3 identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations
4 for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31(2), 406-9.

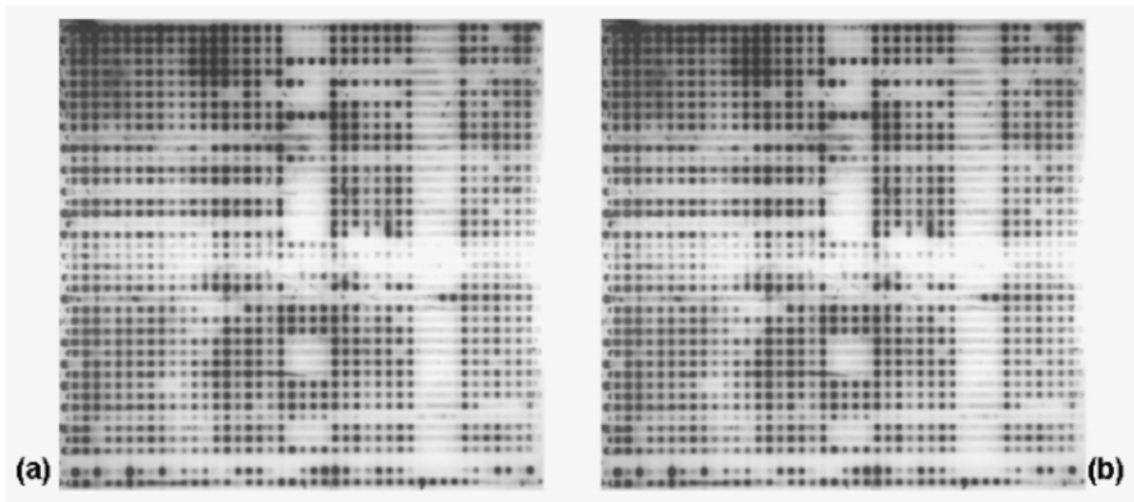
5

6 13. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data (2008). Global tuberculosis Control:
7 surveillance, planning, financing: WHO report 2008. [WHO/HTM/TB/2008.393]. 2008:
8 294 pp. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

9



1
2 **Figure 1.** Multiplex PCR amplification products from various *Mycobacterium*
3 *tuberculosis* DNAs extracted by (a) thermolysis and (b) CTAB methods after
4 electrophoresis on a 1% agarose gel and staining with ethidium bromide. Arrows
5 indicate the fragments with 245 bp.
6 Positive (+) (H₃₇Rv) and negative (-) controls and a 100 bp molecular ladder were used.
7



1

2 **Figure 2.** Spoligotype patterns obtained from various *Mycobacterium tuberculosis*
3 DNAs extracted by (a) thermolysis and (b) CTAB methods. The samples on the 3
4 lowest rows are the negative control and the two positive controls (H₃₇Rv and *M.*
5 *bovis*).