

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Alterações Genéticas Relacionadas com a Resistência à
Rifampicina em *Mycobacterium tuberculosis***

ANDRÉIA ROSANE DE MOURA VALIM

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas-Bioquímica da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Co-orientador: Dra. Maria Lúcia Rosa Rossetti

Porto Alegre – 2000

“Penso que só há um caminho para a ciência ou para filosofia: encontrar um problema, ver a sua beleza e apaixonar-se por ele; casar e viver feliz com ele até que a morte nos separe – a não ser que encontrem outro problema ainda mais fascinante, ou evidentemente, a não ser que obtenhamos uma solução. Mas, mesmo que obtenhamos uma solução, poderemos então descobrir, para nosso deleite, a existência de toda uma família de problemas-filhos, encantadores ainda que talvez difíceis, para cujo bem-estar poderemos trabalhar, com um sentido, até ao fim dos nossos dias.”

Sir Karl Popper

Agradecimentos

À Dra. Maria Lúcia Rossetti que me conduziu nos primeiros passos, pela oportunidade, pela confiança e acima de tudo pela amizade,

Ao Dr. Arnaldo Zaha por sua valiosa orientação e amizade, por seu exemplo de seriedade e profissionalismo, pela sua paciência e consideração,

Às colegas do Laboratório de Biologia Molecular do LACEN: Dea, Ludi, Márcia, Vivian, Cláudia, Patrícia, Simone, Lia, Juliana, Camile e Cida pela amizade e companheirismo, pelos ótimos momentos de convívio e ambiente de trabalho,

Aos colegas do LACEN, em especial à Marta pela sua incansável e inestimável ajuda, à Suzana pelas valiosas discussões e à Rosa pelo alto astral,

Ao Dr. Philip Suffys pela realização e fornecimento dos resultados do teste INNO LiPA,

À Dra. Angela M. W. Barreto do Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, à Dra. Maria Alice Telles do Instituto Adolfo Lutz, à Dra. Clarice Q. F. Leite da USP de Araraquara pelo fornecimento dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis*,

Aos colegas do Centro de Biotecnologia, em especial à Beth, Cristiano, Claudinha, Gustavo, Etel, Marlise, Marilise, Sandra e ao Procópio pela disponibilidade, amizade e atenção,

Ao Dr. Lee Riley pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela possibilidade de cursar sua disciplina na UC Berkeley e pelos conselhos pertinentes,

Aos colegas da School of Public Health na University of Califórnia – Berkeley, em especial para Flávia, Márcia, Lisa, Brendan, pela paciência e inestimável ajuda. À Maria Amélia pela amizade e força num momento tão delicado,

Aos meus pais Dirceu e Dinorá pelos ensinamentos de vida, incentivos e amor constante, às minhas irmãs Sandra e Jaque pela força, à todos os meus familiares pelo carinho,

Ao Marco pelo amor, pelos valiosos auxílios e por estar sempre ao meu lado, sendo uma constante fonte de companheirismo e estímulo,

A todos que de uma maneira ou outra me auxiliaram e apoiaram na realização deste trabalho.

Sumário

1.Apresentação.....	10
2.Revisão Bibliográfica.....	14
2.1.Tuberculose.....	14
2.1.1.A doença	14
2.1.1.1.Incidência da TB.....	14
2.1.1.2.HIV e TB	16
2.1.1.3.O agente infeccioso	17
2.1.2.Definição de termos	18
2.1.2.1.Resistência aos fármacos	18
2.1.2.2.Resistência adquirida.....	19
2.1.2.3.Resistência primária	19
2.1.2.4.Prevalência combinada	19
2.1.2.5.Linhagem selvagem.....	20
2.1.2.6.Quimioterapia antiTB	20
2.1.3.Aspectos moleculares do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
2.1.3.1.Organização e seqüenciamento do genoma.....	20
2.1.3.2.RNA polimerase	21
2.1.3.3.Homologia no gene <i>rpoB</i>	22
2.1.4.Tratamento	22
2.1.4.1.Era pré-quimioterápica e o aparecimento de fármacos antituberculose.....	22
2.1.4.2.Considerações sobre a terapia.....	23
2.1.4.3.Regime terapêutico	23
2.1.4.4.Quimioprofilaxia	25
2.1.4.5.Tratamento em situações de resistência.....	25
2.1.4.6.Os fármacos	26
2.1.4.7.Rifamicinas.....	26
2.1.4.8.Rifampicina	27
2.2.Resistência	28
2.2.1.O surgimento da resistência	28
2.2.2.Estudo realizado pela OMS e IUATLD	29
2.2.3.Mecanismos e fatores associados com a resistência aos fármacos antiTB.....	31
2.2.3.1.Freqüência de mutações espontâneas em <i>M. tuberculosis</i>	31
2.2.3.2.Fatores associados com o desenvolvimento da resistência	34
2.2.4.Fatores associados com o desenvolvimento da resistência	34
2.2.5.Mecanismos da resistência em <i>M. tuberculosis</i>	34
2.2.5.1.Resistência à isoniazida.....	35

2.2.5.2. Resistência à estreptomicina.....	35
2.2.5.3. Resistência à rifampicina.....	35
2.2.6. Testes comerciais disponíveis.....	41
2.3. <i>Epidemiologia molecular da tuberculose</i>	42
2.3.1. Aspectos epidemiológicos.....	42
2.3.2. RFLP.....	43
2.3.3. Etiologia do aparecimento da MDR.....	45
3. Justificativa e Objetivos	46
4. Materiais e métodos	47
4.1. <i>Isolados de Mycobacterium tuberculosis utilizados</i>	47
4.2. <i>Cultura e teste de sensibilidade</i>	47
4.3. <i>Preparação da amostra e reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	48
4.3.1. Extração do DNA cromossomal.....	48
4.3.2. Oligonucleotídeos para a reação de PCR.....	48
4.3.3. Reação de PCR.....	48
4.3.4. Condições da reação	49
4.3.5. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	49
4.4. <i>Seqüenciamento manual</i>	49
4.4.1. Reação de seqüenciamento	49
4.4.2. Preparo dos géis de seqüenciamento.....	50
4.4.3. Eletroforese de DNA em gel de poliácridamida	50
4.5. <i>Clonagem de um fragmento maior do gene rpoB</i>	50
4.5.1. Obtenção do produto de PCR, ligação no vetor e clonagem.....	51
4.6. <i>Seqüenciamento automático</i>	51
4.7. <i>Números de acesso às seqüências de nucleotídeos</i>	52
4.8. <i>Teste das amostras usando protocolo comercial</i>	52
4.9. <i>RFLP</i>	52
4.9.1. Transferência para a membrana	53
4.9.2. Sonda e marcação	53
4.9.3. Análise do RFLP.....	53
5. Resultados	55
5.1. <i>Teste de sensibilidade</i>	55
5.2. <i>Amplificação das regiões genômicas de interesse</i>	57

5.3. Mutações encontradas no gene <i>rpoB</i>	57
5.3.1. Amostras do Rio Grande do Sul	58
5.3.2. Amostras de São Paulo	59
5.3.3. Amostras do Rio de Janeiro	60
5.3.4. Análise geral dos resultados obtidos no seqüenciamento do fragmento de 157 pares de bases	61
5.3.5. Amostras que tiveram uma região maior analisada no gene <i>rpoB</i>	61
5.4. Avaliação dos isolados com INNO-LiPA Rif.TB	63
5.5. RFLP	64
6. Discussão	70
6.1. Caracterização das mutações	70
6.2. Avaliação do teste comercial	74
6.3. RFLP	75
7. Conclusões	78
8 Referências bibliográficas	80
9. Anexos	93

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

AIDS	“Acquired Immune Deficiency Syndrome”
BCG	bacilo de Calmette e Guérin
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
°C	graus Celsius
dCTP	desoxicitidina 5’ trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5’ trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
dTTP	desoxitimidina 5’ trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético; sal sódico
h	horas
HIV	“Human Immunodeficiency Virus”
IPTG	1-isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quilodalton
M	molar
mg	miligrama
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
N	normal
ng	nanograma
nm	nanômetros
nt	nucleotídeo
pb	pares de bases
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
S	segundos
SDS	dodecilsulfato de sódio
TB	tuberculose
Tris	tris (hidroxi-metil) aminometano
U	unidade (atividade enzimática)
UV	radiação ultravioleta
μ g	micrograma
μ l	microlitro

Lista de Tabelas

Tabela 1. Esquema com sugestões terapêuticas de acordo com o nível de resistência	25
Tabela 2. Características dos principais fármacos antiTB	32
Tabela 3. Perfil de resistência dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> MDR obtidos no Brasil	56
Tabela 4. Mutações encontradas no gene <i>rpoB</i> de <i>M. tuberculosis</i> em isolados obtidos de pacientes brasileiros.....	62
Tabela 5. Exemplos de interpretação dos resultados obtidos com INNO-LiPA Rif.TB..	64

Lista de figuras

Figura 1. Taxas de notificação da tuberculose no ano de 1997	15
Figura 2. Prevalência da tuberculose MDR adquirida	30
Figura 3. O desenvolvimento e transmissão da tuberculose resistente a um ou mais fármacos.	33
Figura 4. Modelo de inibição da RNA-polimerase pela rifampicina	36
Figura 5. Aminoácidos substituídos nos códons 509 a 533 da subunidade β da RNAP de <i>M. tuberculosis</i>	38
Figura 6. Representação esquemática do gene <i>rpoB</i> e posição das sondas do kit LiPA.....	42
Figura 7. Análise eletroforética dos produtos de DNA obtidos pela amplificação de região do gene <i>rpoB</i> de <i>M. tuberculosis</i>	57
Figura 8. Auto-radiografia do seqüenciamento direto do produto de PCR.....	58
Figura 9. Auto-radiografia do seqüenciamento direto do produto de PCR.....	59
Figura 10. Análise do resultado do seqüenciamento automático obtida pelo software MacDNASIS de uma linhagem resistente	60
Figura 11. Representação esquemática dos padrões de RFLP e dendograma obtidos de isolados de <i>M. tuberculosis</i> que apresentaram mutação no códon 531 do gene <i>rpoB</i>	66
Figura 12. Dendogramas do Southern blots produzidos com o software GelCompar mostrando os padrões de RFLP e o percentual de similaridades entre os isolados que apresentaram mutação no códon 526 no gene <i>rpoB</i>	67
Figura 13. Padrões de RFLP e dendogramas dos isolados que formaram cluster.....	68
Figura 14. Dendogramas do Southern blots produzidos com o software GelCompar mostrando os padrões de RFLP e o percentual de similaridades entre os isolados obtidos no Rio de Janeiro.	69

Resumo

A tuberculose, uma doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, continua sendo um sério problema de saúde pública. O desenvolvimento de linhagens resistentes aos fármacos utilizados no tratamento da doença, agrava ainda mais essa situação. A resistência à rifampicina (Rif^R) está relacionada com mutações em uma região de 69 pares de base no gene *rpoB*. Neste trabalho foram analisados 132 isolados de *M. tuberculosis* obtidos em três estados do Brasil, dos quais 112 foram considerados resistentes à rifampicina. Foi seqüenciado um fragmento de 157-pb, que contém a região onde ocorrem a maioria das mutações, no gene *rpoB*. A substituição de uma base levando a troca do aminoácido ocorreu em 99 dos isolados Rif^R. Os aminoácidos mais freqüentemente substituídos estavam localizados nos códons 531, 526 e 516, com as freqüências de 56,3%, 23,2% e 6,3%, respectivamente. Também ocorrem substituição de duas bases no mesmo códon em 4 isolados Rif^R (3,5%). Mutações em códons separados ocorreram em 4 isolados (3,5%) e mutações associadas com deleção foram observadas em dois isolados. Neste estudo foram observadas 22 diferentes tipos de mutações, sendo que seis destas ainda não haviam sido descritas anteriormente. Em três isolados Rif^R não foram encontradas mutações na região analisada, sendo analisado uma região maior do gene. Não foi observada nenhuma mutação na região de 157-pb em 20 isolados sensíveis à rifampicina. Os resultados do seqüenciamento foram comparados com os resultados obtidos com um teste comercial – INNO LiPA Rif.TB. A eficiência do teste comercial em detectar as mutações relacionadas com a resistência à rifampicina foi de 91%. Foram também analisados 55 isolados pela técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphism). Estas análises revelaram que a resistência à múltiplos fármacos está relacionada com diversas linhagens de *M. tuberculosis*, e que apenas em alguns casos mutações específicas no gene *rpoB* estão relacionados com padrões específicos de RFLP.

Palavras-chaves: tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, MDR-TB, gene *rpoB*, resistência, rifampicina, RFLP.

Abstract

Mutations in a 69-bp region of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* are associated with rifampin resistance (Rif^R). We have studied 132 *M. tuberculosis* isolates from three States of Brazil, 112 of which were resistant to rifampin. A 157-bp fragment containing the 69-bp region of the *ropB* gene was analyzed. A single-base substitution occurred in 99 Rif^R isolates. The amino acids changes most frequently observed in point mutations were in codons 531, 526, and 516, with frequencies of 56,3%, 23,2%, and 6,3%, respectively. Double-base substitution (in the same codon) occurred in 4 Rif^R isolates (3,5%). Mutation in two separate codons occurred 4 times (3,5%), and mutations associated with deletion were found in 2 isolates. One isolate had 4 codons deletion. Twenty-two different kinds of mutations were identified in 112 Rif^R isolates, six of which had not been reported previously. We did not find any mutation in the 69-bp region of three Rif^R isolates. In this isolates a large region was sequenced. We did not detect any mutation in the 157-bp region of twenty rifampin sensitive isolates. The sequencing results were compared whit results from commercial kit – INNO LiPA Rif.TB. The efficiency of this test to detect mutations related with Rif^R was 91%. We have also analyzed 55 of these isolates by restriction fragment length polymorphism (RFLP) based on IS6110. They revealed that in Brazil, multidrug resistant *M. tuberculosis* were comprised of a diverse set of strains, and that, in some cases, strains with certain *rpoB* mutations were associated with specific IS6110 RFLP profiles.

Keywords: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, MDR-TB, *rpoB* gene, resistance, rifampin, RFLP.

1. Apresentação

A tuberculose (TB), conhecida como “o antigo flagelo” ou “doença da antigüidade”, está voltando a ter um impacto sócio-econômico semelhante ao existente no período em que Robert Koch descobriu o *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da TB. Apesar do controle e dos regimes terapêuticos usados para combater a TB terem melhorado, existem problemas inerentes à doença que incluem o surgimento de linhagens resistentes aos fármacos usados no tratamento, a alta correlação da incidência da doença em populações pobres e a ligação da doença com o alcoolismo. Todos estes fatores que dificultam o controle e por fim a erradicação da tuberculose. Recentemente mais um importante fator somou-se aos anteriores, a imunodepressão causada pelo vírus HIV cria as condições ideais para a transformação da TB em uma doença oportunista. Chega-se então ao impressionante número de 8 milhões de novos casos e 2 milhões de mortes causadas pela TB mundialmente, a cada ano (<http://www.hopkins-TB.org/news/index.shtml>).

O Brasil ocupa o 10º lugar entre os 22 países que são responsáveis por 80% dos casos estimados de TB no mundo. A incidência da doença no país no ano de 1997 foi de 51,7 casos por 100.000 habitantes, e ocorreram cerca de 6.000 óbitos em função da doença. No mesmo ano foram notificados 83.309 casos (de um total estimado de 129.000). Atualmente, 75% dos casos notificados são curados e 14% abandonam o tratamento (Netto, 1999).

As novas técnicas de biologia molecular têm contribuído muito no estudo das linhagens resistentes, pois tornam possível o entendimento dos locais de ação dos fármacos e os mecanismos pelos quais os organismos adquirem a resistência a eles, possibilitando, também, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a rápida identificação de linhagens resistentes.

O entendimento das bases genéticas da resistência aos fármacos está sendo alcançado com o desenvolvimento de métodos baseados na análise de DNA para detectar a resistência aos fármacos antiTB. A isoniazida e a rifampicina são os principais fármacos usados no tratamento da TB.

A resistência à isoniazida parece ocorrer primeiro, seguido do desenvolvimento da resistência à rifampicina, resultante de mutações no gene *rpoB* que levam o *M.*

tuberculosis tornar-se rapidamente resistente a ambos os fármacos. Os sítios de mutação no DNA do *M. tuberculosis* relacionados com a resistência a isoniazida ainda não estão tão elucidados quanto os sítios relacionados com a resistência à rifampicina. Esses fatores tornam a rifampicina um excelente marcador das linhagens que são caracterizadas como MDR.

Com este trabalho buscou-se ampliar o conhecimento sobre as linhagens de *M. tuberculosis* circulantes no estado do Rio Grande do Sul (RS), São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ) caracterizando as mutações que ocorrem no gene *rpoB* e o perfil de RFLP. O objetivo foi observar se as linhagens resistentes a múltiplos fármacos eram limitadas a um número definido de padrões de RFLP e correlacionar o tipo de alelo mutado no gene *rpoB*.

A primeira parte deste trabalho consta de uma revisão bibliográfica sobre a TB, as mais recentes pesquisas relacionadas com a resistência à rifampicina e a epidemiologia do *M. tuberculosis*. Buscou-se revisar a forma pela qual a tipificação dos isolados de *M. tuberculosis*, através do uso de técnicas de biologia molecular, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares de resistência aos fármacos e como ocorre a transmissão das linhagens resistentes. Essas informações epidemiológicas são essenciais para auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o controle da doença. A seção de materiais e métodos reporta as condições de como foi desenvolvido o trabalho. A seguir descreve-se os resultados obtidos nos experimentos realizados, e finalmente, como foram interpretados com base na literatura atual. Buscou-se caracterizar quais as mutações no gene *rpoB* do *M. tuberculosis* que são associadas com a resistência à rifampicina, e com especial atenção para as mutações até então não descritas na literatura.

Tendo consciência que o surgimento de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiplos fármacos traz um sério problema no controle da TB, espera-se com esses resultados poder contribuir no desenvolvimento de um método de diagnóstico rápido para realizar o teste de sensibilidade em isolados clínicos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Tuberculose

2.1.1. A doença

A micobactéria pode causar doença em qualquer órgão do corpo, mas os pulmões são os sítios normalmente afetados. A maioria das infecções causadas pela *Mycobacteria* é resultante da inalação de gotículas produzidas por uma pessoa infectada quando tosse, espirra ou até mesmo quando fala. Essas gotículas são pequenas o suficiente para escapar da captura pelo aparato mucociliar bronquial, e então começar a multiplicar-se. A multiplicação continuará por semanas, enquanto o corpo responde à infecção com o desenvolvimento da resposta imune mediada por células.

Inicialmente, os organismos são fagocitados pelos macrófagos alveolares e transportados para os linfonodos regionais. A partir daí, ocorre a disseminação hematogênica. Aproximadamente 2 a 10 semanas após a infecção em hospedeiro normal, o sistema imune, mediado por células, pára a multiplicação da micobactéria impedindo a progressão da doença (Chambers & Schecter, 1997).

Um terço da população mundial teve contato com o agente da TB, mas não desenvolveram a doença. Dentro de 2 anos, 5% terão TB ativa. Os 95% restantes não desenvolverão TB a menos que sejam expostos a severos fatores de estresse, como imunodeficiência causada pelo HIV ou mal nutrição.

2.1.1.1. Incidência da TB

Apesar dos esforços empreendidos mundialmente no controle da TB, observa-se nos últimos anos, elevação na incidência da doença e o aparecimento de linhagens resistentes aos esquemas de tratamento usuais. No ano de 1993 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a TB uma emergência mundial.

A OMS notificou no ano de 1997 3.368.879 casos de TB, sendo que a maior parte dos casos ocorreram nos países em desenvolvimento (WHO, 1999), conforme mostra o mapa com o casos notificados neste ano.

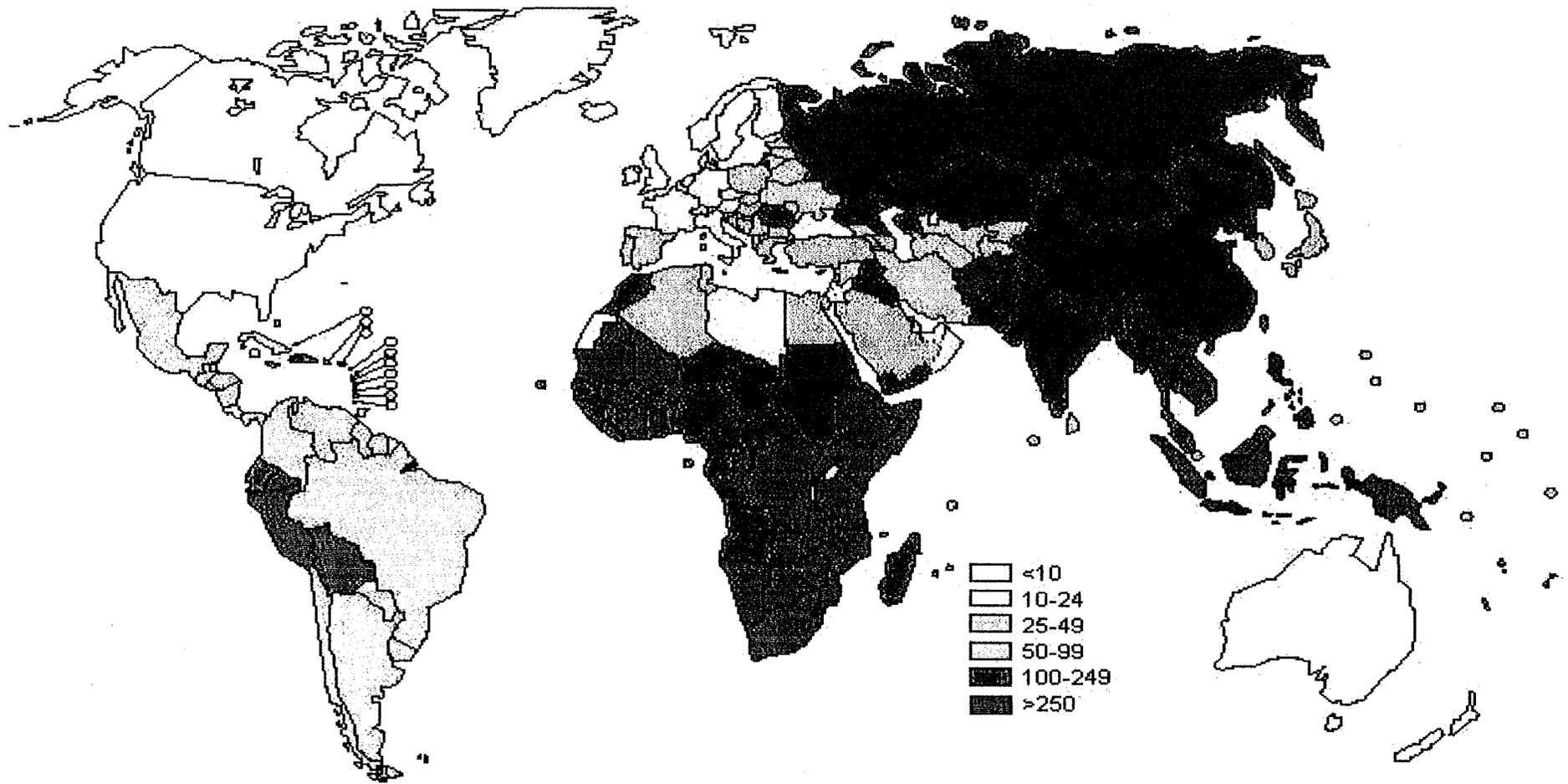


Figura 1. Taxas de notificação da tuberculose no ano de 1997, segundo WHO, 1999. Média das taxas por 100.000 habitantes.

No Brasil, a TB é uma doença prevalente, e, apesar do Programa Nacional para o Controle da TB (PNTB), foram descritos mais de 85.000 novos casos no ano de 1996, dos quais uma substancial proporção representa co-infecção com o HIV (Brasil, 1997). A região sudeste é responsável por quase metade de todos os casos, sendo que no estado do Rio de Janeiro a incidência anual aumentou de 80/100.000 em 1987 para 126,8/100.000 em 1995 (Mello, 1998). Em São Paulo, a maior cidade da América do Sul, a incidência, no mesmo ano, foi de 57 casos de TB para cada 100.000 habitantes (Ferrazoli *et al.*, 2000). No Rio Grande do Sul o índice no ano de 1998 foi de 52/100.000, sendo que 40% dos casos são notificados na região metropolitana de Porto Alegre (dados da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul). No ano de 1996 a incidência da TB foi calculada por estado e suas regiões metropolitanas (www.datasus.gov.br/cgi/idb97/morb/do202.htm).

Segundo a OMS o Brasil permanece como o segundo país com maior incidência de TB, que ainda não adotou o sistema de tratamento preconizado – o DOTS (Direct Observed Therapy System). A taxa de detecção de casos foi de aproximadamente 80% no período de 1995 a 1997. O Ministério da Saúde declarou a TB como prioridade no ano de 1998 (WHO, 1999).

O aumento na frequência de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais agentes normalmente usados no tratamento é um fator que torna a TB uma doença muito mais agressiva. Os níveis de resistência a um ou mais fármacos antituberculose (antiTB), em alguns casos, alcançam 13 % e 3,2 % são resistentes à rifampicina e isoniazida (Kochi *et al.*, 1993).

2.1.1.2. HIV e TB

As pessoas infectadas com HIV têm 100 a 200 vezes mais chances de desenvolver TB após o contato com o *M. tuberculosis*, comparativamente, às crianças imunologicamente normais com menos de 4 anos, que têm 20 vezes mais chances de desenvolverem a doença que os adultos (Chambers & Schechter, 1997).

Na TB associada com HIV, a presença do produto de citocinas pode ativar a sensibilidade do paciente ao desenvolvimento da TB, bem como acelerar a progressão do paciente HIV para a AIDS. Estudos mostram que os monócitos dos pacientes com

TB produzem níveis aumentados de HIV, mesmo aqueles monócitos que não contêm *M. tuberculosis* (Pechère, 1996).

Devido ao desajuste da imunidade mediada por células nos pacientes com o HIV, o sistema imune é incapaz de impedir o desenvolvimento do *M. tuberculosis*. O sistema imune dos pacientes com AIDS não consegue limitar a multiplicação do *M. tuberculosis* que ocorre nos estágios iniciais da infecção, resultando em TB primária e em disseminação com envolvimento de múltiplos sítios. Ocorre uma rápida multiplicação dos organismos, com frequência, simultaneamente em múltiplos órgãos. Os pacientes HIV positivos previamente infectados com o bacilo podem desenvolver TB por reativação, devido a perda gradual da imunidade mediada por células (Chambers & Schecter, 1997).

A resistência a múltiplos fármacos é fortemente associada com a AIDS e HIV soropositivo. A resistência aos fármacos pode ser relacionada com a infecção com o HIV por dois caminhos diferentes. Primeiro, a não adesão ao tratamento, em grupos da população como usuários de drogas e desabrigados que têm alto risco de infecção com o HIV. Assim, linhagens MDR são provavelmente geradas nestes grupos como resultado da não adesão ao tratamento da TB. Segundo, há uma transmissão ativa entre os HIV positivos e pacientes com AIDS, particularmente em setores congregados, como resultado de um fenômeno relacionado, isto é, a rápida geração de novos casos de infecção provindas de pessoas com infecção recente entre pessoas que podem ser suscetíveis à doença. Uma vez que a população não aderente ao tratamento tem alto risco de desenvolver a infecção pelo HIV e AIDS, o desenvolvimento e a transmissão de linhagens MDR tem probabilidade de ser encontradas na mesma população.

Os problemas com TB MDR em associação com HIV positivos pouco são descritos nos países em desenvolvimento, mas há um alto potencial para esse tipo de associação em países com um grande número de usuários de drogas intravenosas e onde a TB é endêmica, como é o caso do Brasil (Smith & Moss, 1994).

2.1.1.3. O agente infeccioso

O agente infeccioso é o *Mycobacterium tuberculosis* também chamado de bacilo de Koch. É uma bactéria aeróbica, parasita intracelular facultativo causador de patologia intracelular, possui um complexo envelope celular, homogeneidade genética e rápido desenvolvimento de mutantes resistentes aos fármacos. Também se caracteriza

por apresentar dormência metabólica, permanecendo no interior do macrófago em atividade metabólica muito reduzida e sobrevivendo por anos no organismo humano (Cole *et al.*, 1998).

O gênero *Mycobacterium* é o único da família *Mycobacteriaceae*. A espécie *M. tuberculosis* pertence ao complexo denominado complexo *M. tuberculosis*, dos quais também fazem parte *M. bovis*, *M. microti* e *M. africanum*. As micobactérias possuem alto conteúdo lipídico na sua parede celular, não coram prontamente pelo método de Gram mas são consideradas gram positivas, não formadoras de esporos e com ausência de motilidade.

O tempo de geração do *M. tuberculosis*, em meio sintético ou em animais infectados, é de aproximadamente 24 horas. Isto contribui com a natureza crônica da doença e impõe prolongados regimes terapêuticos. Determina reação inflamatória localizada (nódulo ou granuloma) e necrose tecidual (lesão cavitária). Nas lesões nodulares, a população bacteriana é da ordem de 10^5 microrganismos e nas cavitárias de 10^8 bacilos (Fuchs & Wannmacher, 1992).

Das outras quase 20 espécies do gênero *Mycobacterium*, somente o *M. bovis* causa TB no hospedeiro normal. Já os imunodeprimidos podem desenvolver a doença a partir da infecção por várias espécies como *M. kansasii*, *M. fortuitum* e *M. avium*.

2.1.2. Definição de termos

2.1.2.1. Resistência aos fármacos

A resistência aos fármacos é definida como a diminuição da sensibilidade *in vitro* do *M. tuberculosis* em um grau suficientemente razoável a qual a difira de uma linhagem selvagem, que nunca teve contato com o fármaco. Segundo recomendações da OMS a resistência a cada um dos fármacos deve ser determinada de acordo com testes bacteriológicos. O termo *mono-resistência* é usado quando uma linhagem é resistente a apenas um fármaco, *poli-resistência* é usado para significar resistência a mais de um fármaco. O termo *multidroga resistência* é definido como resistência à isoniazida e rifampicina, com ou sem resistência aos agentes adicionais (WHO, 1997). Estes dois fármacos representam a mais potente combinação contra o bacilo da TB e constituem a base do tratamento.

2.1.2.2. *Resistência adquirida*

Quando os pacientes diagnosticados com TB iniciam o tratamento antiTB, e o bacilo desenvolve resistência a um ou mais fármacos usados durante o tratamento diz-se que a bactéria apresenta “resistência adquirida”. Isso só pode ser demonstrado se o teste de sensibilidade é realizado antes de iniciar o tratamento. Porém, a OMS em sua recente pesquisa global (WHO, 1997) considerou resistência adquirida em pacientes que receberam previamente, pelo menos por um mês, o tratamento antiTB, conforme registros médicos. A resistência adquirida também foi considerada nos casos de cultura positiva, seguindo as seguintes categorias: pacientes com falência no tratamento, pacientes que falharam em completar o tratamento e pacientes que retornaram após a interrupção do tratamento. Essas definições e termos são consistentes com aquelas descritas previamente pela OMS (WHO, 1994).

2.1.2.3. *Resistência primária*

A resistência primária a fármacos é descrita como aquela encontrada em pacientes que nunca receberam tratamento, nem qualquer medicação antiTB no passado, isto é, pacientes infectados com linhagens resistentes a fármacos. Como a história do tratamento antiTB é frequentemente incorreta, a resistência primária é difícil de ser identificada.

A resistência primária, usada pela OMS na recente pesquisa (WHO, 1997), foi definida como a presença de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes em pacientes que, em resposta ao questionamento direto, negaram haver recebido tratamento antiTB por mais de um mês.

2.1.2.4. *Prevalência combinada*

A despeito da importância de distinguir entre resistência primária e adquirida, a prevalência combinada de resistência aos fármacos é usada por muitas razões, aproximando a proporção de linhagens resistentes circulantes na comunidade. Ela indica a prevalência da resistência aos fármacos entre todos os casos de TB, independente de tratamento anterior, em um dado ano e país.

2.1.2.5. *Linhagem selvagem*

Uma *linhagem selvagem* é definida como uma linhagem do complexo *M. tuberculosis* que nunca foi exposta a qualquer fármaco antiTB. *Linhagens naturalmente resistentes* são linhagens selvagens espécie-específicas, que naturalmente apresentam resistência a fármacos específicos, como *M. bovis* é resistente a pirazinamida ou *M. tuberculosis* é resistente à penicilina.

2.1.2.6. *Quimioterapia antiTB*

A *quimioterapia antiTB* refere-se ao tratamento baseado nos fármacos mais freqüentemente usados, como isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA), estreptomicina (SM) e etambutol (EMB). A *terapia a curto prazo* é o regime terapêutico recomendado pela OMS, que consiste em dois meses de INH, RMP, PZA (e em alguns casos, mais um quarto fármaco— SM ou EMB) seguido de 4 meses de INH e RMP. *Tratamento supervisionado de curta duração (DOTS)*, significa que o paciente é assistido no momento da ingestão do medicamento antiTB.

2.1.3. Aspectos moleculares do *Mycobacterium tuberculosis*

2.1.3.1. *Organização e seqüenciamento do genoma*

Recentemente o genoma completo da linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* foi seqüenciado. O DNA deste organismo é composto de 4.411.529 pb, contém em torno de 4.000 genes, e um conteúdo de G + C de 65,5%, o qual é refletido na composição dos aminoácidos das proteínas. Este genoma é rico em DNA repetitivo, particularmente seqüências de inserção. O conteúdo de G + C é constante em todo o genoma, indicando provável ausência de transferência horizontal de genes envolvidos com a patogenicidade. Várias regiões mostram alta média deste conteúdo, correspondendo a seqüências pertencentes a grandes famílias gênicas, que incluem seqüências polimórficas ricas em G e C (PGRSs) (Cole *et al.*, 1998).

Há uma grande diferença entre *M. tuberculosis* e as outras bactérias. Esta diferença está relacionada com uma grande proporção da capacidade codificante do DNA micobacteriano ser direcionada à produção de enzimas envolvidas na lipólise, e, duas novas famílias de proteínas ricas em glicina com uma estrutura repetitiva que pode representar uma fonte de variação antigênica (Cole *et al.*, 1998).

O *M. tuberculosis* é naturalmente resistente a muitos antibióticos, tornando o tratamento da TB difícil. Esta resistência é devida principalmente ao envelope celular altamente hidrofóbico, que atua como uma barreira da permeabilidade (Brennan & Draper, 1994), mas também muitos potenciais determinantes da resistência são codificados no genoma. Estes incluem enzimas hidrolíticas ou fármaco-modificadoras como as β -lactamases e acetil aminoglicosídeos transferases, e, muitos potenciais sistemas de efluxo de fármacos, como os 14 membros da maior família facilitadora e os numerosos transportadores ABC (Cole *et al.*, 1998).

2.1.3.2. RNA polimerase

A função primária da RNA polimerase (RNAP) é produzir transcritos de RNA para a manutenção ou desenvolvimento da célula. Durante os ciclo de transcrição a RNAP e outros fatores localizam as regiões promotoras na dupla fita de DNA, formam o complexo aberto próximo ao sítio de início da transcrição, iniciam a síntese da cadeia de RNA, alongam completamente o RNA mantendo o DNA molde desnaturado e finalmente liberam o RNA quando encontram um sinal específico de terminação (Zhang *et al.*, 1999).

As RNA polimerases melhores caracterizadas são as de eubactérias, das quais a da *E. coli* é a mais conhecida. Um único tipo de RNAP parece ser responsável pela síntese de mRNA, do rRNA e tRNA. Em torno de 7000 moléculas de RNAP estão presentes na célula de *E. coli*. A maioria está envolvida com a transcrição, provavelmente 2000 a 5000 enzimas estão sintetizando RNA em qualquer tempo, sendo que este número depende das condições de crescimento (Lewin, 1997).

A enzima completa ou holoenzima em *E. coli* tem uma massa molecular de 464 kDa, e, é composta pelas subunidades $\alpha_2\beta\beta'\sigma$, podendo ser separada em dois componentes, a enzima central ($\alpha_2\beta\beta'$) e o fator sigma (o polipetídeo σ).

A enzima central pode fazer a polimerização do RNA mas requer a subunidade σ para iniciar a transcrição sítio específica nos promotores. Os genes que codificam as subunidades α , β , β' e σ são denominados *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* e *rpoD*, respectivamente (Miller *et al.*, 1994).

As subunidades β e β' juntas formam o centro catalítico, e suas seqüências são relacionadas às subunidades maiores das RNA polimerases de eucariotos, sugerindo que

há características comuns para a ação de todas as RNAPs. A subunidade β pode enrolar-se no DNA molde, no RNA transcrito e nos ribonucleotídeos substratos. As mutações nos genes *rpoB* e *rpoC* afetam todos os estágios da transcrição. A subunidade α é necessária para o reconhecimento do promotor pela enzima central e na interação com alguns fatores regulatórios. Essas funções individuais são aproximadas, provavelmente cada subunidade contribua para a atividade da enzima central como um todo e não em ações compartimentalizadas (Lewin, 1997).

2.1.3.3. Homologia no gene *rpoB*

O gene *rpoB* que codifica a subunidade β da RNAP (anexo 6) demonstra ser conservado entre *Bacteria* (Ovchinnikov *et al.*, 1981) e *Archae* (Klenk & Zillig, 1994). A homologia no gene *rpoB* de *E. coli* e *M. tuberculosis* é de aproximadamente 60% (Mollet *et al.*, 1998).

Willians *et al.* (1994), usando a técnica de PCR para amplificar a região determinante de resistência à rifampicina, analisaram isolados de *M. avium*, que mostraram 90% de homologia com as seqüências nucleotídeos de *M. leprae* e *M. tuberculosis*. Enquanto *M. africanum* mostrou 100% de homologia ao *M. tuberculosis*. A seqüência deduzida de aminoácidos do *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium* e *M. africanum* mostra 100% de identidade, indicando uma alta conservação natural desta região da seqüência do gene *rpoB* em micobactéria patogênica.

No anexo 7 podemos observar o alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida da subunidade β de *M. tuberculosis* com a seqüência da subunidade β de *M. leprae*, *E. coli* e de cloroplastos de tabaco, conforme elucidado por Miller *et al.* (1994).

2.1.4. Tratamento

2.1.4.1. Era pré-quimioterápica e o aparecimento de fármacos antituberculose

Até 1944 vários fármacos foram testados para a TB, sem sucesso. Neste ano, Waksman empregou, pela primeira vez, a estreptomicina no tratamento da TB, mudando o curso da doença. A partir da Segunda Guerra Mundial houve o desenvolvimento de outros fármacos com propriedades antibacterianas e antiTB

diminuindo as taxas de mortalidade mundialmente, sendo que os novos fármacos foram gradualmente incorporados ao arsenal terapêutico (Blanchard, 1996).

A partir da introdução da estreptomicina, que reverteu o efeito da doença pulmonar e extrapulmonar, levando a uma maior sobrevivência dos pacientes, ocorreu uma evolução do tratamento da TB. Foi adicionado algum tempo depois o ácido para-aminosalicílico, que era necessário para evitar a seleção de micobactéria resistente. Em 1952 a isoniazida foi disponibilizada, e sendo um agente mais eficiente que a estreptomicina ou ácido para-aminosalicílico, levou a TB ser curável na maioria dos pacientes. Em 1965, a rifampicina foi reconhecida como um potente fármaco anti-TB. A combinação de regimes terapêuticos contendo INH e RMP mostrou-se bastante eficiente no tratamento da TB.

2.1.4.2. Considerações sobre a terapia

A terapia da TB é complicada pelo lento crescimento do *M. tuberculosis* que leva em torno de 20 horas para multiplicar-se, um tempo bastante longo quando comparado com o rápido crescimento da micobactéria saprófita *Mycobacterium smegmatis* (2 a 3 h). Este período de crescimento aumenta o tempo necessário para a quimioterapia, que é complicada também pela atividade metabólica e sua localização celular. Mitchison (1985) sugeriu que a população micobacteriana patogênica pode ser dividida em quatro componentes: (i) metabolização ativa e crescimento rápido, (ii) semidormente com ambiente intracelular ácido, (iii) semidormente com ambiente intracelular não ácido e (iv) dormente. Esta última apresenta uma propriedade única de infecção micobacteriana: o organismo é capaz de sobreviver quiescente por anos ou décadas. Uma quimioterapia efetiva para TB deve incluir ação bactericida inicial contra o rápido crescimento do organismo e subsequente esterilização da população bacilar semidormente e dormente (Blanchard, 1996).

O tratamento da TB deve ser feito sempre com associação de fármacos, evitando assim o desenvolvimento de linhagens resistentes (Korolkovas, 1995).

2.1.4.3. Regime terapêutico

Na década de 60 o regime padrão para o tratamento da TB eram 2 meses de SM, INH e tiacetazona seguido de 16 meses de INH e tiacetazona. Em alguns regimes havia a indicação que os fármacos deveriam ser administrados intermitentemente. Desde a

introdução da SM, foram feitas várias pesquisas para avaliar a eficácia de diferentes regimes terapêuticos (D'Esopo, 1982). Nos anos 70, uma série de estudos mostrou que a TB poderia ser tratada em 6 a 8 meses com regimes contendo múltiplos fármacos em fase intensiva. Essas triagens mostraram que a RMP era o mais importante fármaco de uma terapia em curto período (Murrey, 1994).

Em 1993, a OMS e a American Thoracic Society recomendaram o atual regime, onde o tratamento das formas ativas da TB é feito com esquema tríplice na fase inicial, usando-se associação de INH, RMP e PZA por 2 meses, seguido por mais 4 meses de terapia com INH e RMP em todas as formas pulmonares e extrapulmonares, exceto meningite (Korolkovas, 1995). Durante o tratamento, os pacientes devem ser regularmente monitorados por exames clínicos, radiológicos e bacteriológicos (Pechère, 1996).

O tratamento da TB abrange uma fase de ataque e uma de manutenção. Na primeira associam-se INH, RMP e PZA, a fim de rapidamente reduzir a franca proliferação celular e impedir a resistência adquirida, utilizando bactericidas potentes (INH e RMP) e com atividade intracelular (PZA). Reduzida a população bacteriana, o que ocorre em dois meses, passa-se à fase de manutenção, objetivando destruir os germes que se encontram extracelularmente, no material caseoso. Isso é feito com INH e RMP (Fuchs & Wannmacher, 1992).

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

A OMS recomenda o uso da Terapia Supervisionada de Curta Duração (DOTS) para pacientes com TB ativa. O sucesso no tratamento é indicado pelo resultado de uma cultura negativa do escarro em dois meses e desaparecimento dos infiltrados na radiografia pulmonar entre 4 a 6 meses (Bradford *et al.*, 1996).

Para a TB extrapulmonar, nas formas miliar, meningítica e óssea, é recomendada uma terapia mais prolongada. As tabelas nos anexos 3, 4 e 5 mostram a terapia preconizada pelo Ministério da Saúde em diversas situações (Brasil, 1995).

2.1.4.4. Quimioprofilaxia

Na quimioprofilaxia utiliza-se a isoniazida, indicada para os contactantes de pacientes tuberculosos bacilíferos, sobretudo os recém-nascidos que não podem ser afastados do domicílio, as crianças menores de 5 anos e os reatores tuberculínicos fortes (cujo risco de adoecer é duas vezes maior que os contactantes não-reatores); nos contactantes acima de 35 anos de idade, a quimioprofilaxia se restringe aos indivíduos com definido risco de contrair a doença. Caso o contato do paciente infectado por *M. tuberculosis* resistente a INH, a quimioprofilaxia pode ser feita com RMP (Fuchs & Wannmacher, 1992).

2.1.4.5. Tratamento em situações de resistência

As linhagens resistentes aos fármacos surgem quando a quimioterapia é intermitente ou inadequada. Vários fatores influenciam o grau de sucesso no programa de tratamento da TB, incluindo duração e complexidade da terapia, fácil acesso ao centro de saúde, custo do tratamento, adesão do paciente, e efeitos adversos dos fármacos. E ainda, alguns dados sugerem que pacientes HIV positivos podem ter elevado risco de desenvolverem TB resistente à rifampicina, talvez devido à problemas na absorção do fármaco (CDC, 1996).

Apesar da introdução da terapia combinada, a resistência aos antibióticos continuam sendo um problema, particularmente nos países em desenvolvimento. Isto é freqüente pois o paciente não adere totalmente ao tratamento, levando ao desenvolvimento da resistência.

Tabela 1. Esquema com sugestões terapêuticas de acordo com o nível de resistência.

Perfil de resistência	Regime terapêutico	Duração do tratamento
INH, SM	RMP, PZA, EMB, AMK	6 – 9 meses
INH, EMB, ±SM	RMP, PZA, FQ, AMK	6 – 12 meses
INH, RMP, ±SM	PZA, EMB, FQ, AMK	18 – 24 meses
INH, RMP, EMB, ±SM	PZA, FQ, AMK, + outros 2 agentes ¹	24 meses após negativar o escarro
INH, RMP, PZA, ±SM	EMB, FQ, AMK, + outros 2 agentes	24 meses após negativar o escarro
INH, RMP, EMB, PZA, ±SM	FQ, AMK + 3 outros agentes	24 meses após negativar o escarro

AMK (amicacina), FQ (fluoroquinolona).1. Outros agentes: ETH, cicloserina, ácido p-aminosalicílico (Pechère, 1996).

As recomendações para o tratamento da TB MDR são baseadas na limitada experiência em certos centros de referência (Iseman *et al.*, 1993). Mas sugere-se nestes casos dar ao paciente três antibióticos aos quais a bactéria seja ainda sensível, e é recomendado que pelo menos um dos antibióticos seja administrado por via parenteral. O período de tratamento aumenta para 9 a 12 meses, sendo recomendado um período maior ainda em pacientes co-infectados com HIV. Sugestões terapêuticas, de acordo com o tipo de resistência, são apresentadas na tabela 1.

2.1.4.6. Os fármacos

O desenvolvimento de agentes quimioterapêuticos para o tratamento das doenças microbianas foi uma das mais importantes descobertas do século XX. A era antimicrobiana inicia com a descoberta e desenvolvimento das sulfonamidas na década de 30. E a partir daí até o presente momento, muitos outros agentes foram descobertos, dos quais tem-se fármacos específicos para o tratamento de infecções micobacterianas.

Os agentes eficazes contra a micobactéria podem ser divididos em duas categorias (Chopra & Brennan, 1998):

1. agentes de amplo espectro que tem atividade contra micobactéria e muitas outras espécies bacterianas: cicloserina, fluoroquinolonas, macrolídeos, rifamicinas, estreptomicinas;

2. agentes que têm espectro específico, com atividade restrita a micobactéria, ou mesmo a apenas espécies micobacterianas: capreomicina, clofazimina, etambutol, etionamida, isoniazida, ácido paraminosalicílico, pirazinamida e tiacetazona.

As bases do mecanismo para essa divisão podem ser explicadas assumindo que os agentes da primeira categoria interagem com alvos moleculares encontrados em um amplo espectro de bactérias, incluindo a micobactéria. Em contraste, os agentes com espectro micobacteriano podem interagir com alvos presentes apenas nestes organismos. A atividade específica antimicobacteriana pode também resultar se os agentes são convertidos de pró-fármacos inativos por mecanismos específicos das micobactérias.

2.1.4.7. Rifamicinas

As rifamicinas constituem um grupo de antibióticos macrocíclicos complexos, estruturalmente semelhantes, obtidos a partir de filtrados celulares de *Streptomyces*

mediterranei (Gilman, 1990). Devido a baixa atividade antimicrobiana da rifamicina B, apenas os seus derivados semi-sintéticos é que são usados terapêuticamente. As rifamicinas, que são antibióticos de amplo espectro, estão entre os mais importantes agentes anti-micobacterianos. A rifampicina e o rifanbutin estão incluídos no regime terapêutico para o tratamento da TB, lepra e infecções micobacterianas em pacientes com AIDS. A rifapentina, que apresenta uma atividade 10 vezes maior que a rifampicina contra o *M. tuberculosis* e melhores propriedades farmacocinéticas, está atualmente sendo testada como um novo componente para o tratamento da TB, assim como novas benzoaxazina-rifampicinas estão sendo desenvolvidas (Chopra & Brennan, 1998).

2.1.4.8. Rifampicina

Estruturalmente a rifampicina consiste de um cromóforo naftoquinônico que alcança a cadeia alifática entre o nitrogênio no C₂ e o oxigênio no C₁₂. É um derivado do 3,4-(metilpiperazinil-iminometilidina)-rifamicina SV e foi introduzido como potente agente anti-TB em 1972 (Lal & Lal, 1994). Tem atividade contra uma ampla variedade de bactérias álcool-ácido resistentes e várias outras micobactérias de crescimento lento, *M. leprae*, *M. kansasii*, *M. haemophilum* e *M. marinum*, e, tem atividade variável contra o complexo *M. avium* (MAC), sendo inativa nas micobactérias de crescimento rápido. É bactericida para microrganismos extracelulares e intracelulares devido sua lipossolubilidade (Gilman, 1990).

A rifampicina inibe a RNA polimerase procariótica dependente de DNA por ligar-se à subunidade β no presumido centro catalítico da enzima, impedindo a iniciação da transcrição. A subunidade β deve estar complexada com o trímero $\alpha_2\beta'$ para que ocorra a incorporação correta de nucleotídeos e os RNAs possam ser sintetizados. Com a ligação da rifampicina, o complexo fármaco-subunidade β é formado, abortando então a síntese de RNAs e, conseqüentemente os processos de tradução (Santos, 1996).

A RNA polimerase de mamíferos é inibida pela rifampicina apenas em concentrações significativamente altas. A rifampicina é bem absorvida pelo trato gastrointestinal e o pico de concentração de 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ é alcançado em 1 ou 2 h após a dose oral de 600 mg. As concentrações no sistema nervoso central alcançam 50% dos níveis plasmáticos, durante a inflamação meníngea. As concentrações próximas de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina são bactericidas para os isolados sensíveis de *M. tuberculosis*,

tendo ação intracelular no bacilo que está se replicando lentamente na lesão caseosa, bem como no bacilo que está em replicação ativa, em cavidades pulmonares abertas (Inderlied, 1994). As reações adversas causadas pelo fármaco são reações gastrointestinais e de hipersensibilidade. Entretanto, o maior efeito é a hepatotoxicidade e descoloração da urina, lágrima e outros fluídos corporais. A rifampicina também induz um aumento do metabolismo hepático de uma ampla variedade de fármacos (Mandell *et al.*, 1995).

Os inibidores de proteases, usados para combater o HIV, interagem com a rifampicina de duas distintas maneiras: (i) a rifampicina induz as citocromos oxidases no citocromo P450 aumentando o metabolismo dos fármacos inibidores de proteases, levando-os a níveis subterapêuticos, (ii) e os inibidores de proteases por sua vez aumentam o nível sérico da rifampicina aumentando a toxicidade deste fármaco (CDC, 1996).

2.2. Resistência

2.2.1. O surgimento da resistência

A síntese do Prontosil Rubrum por Klarer e Mietzsch (1932) que levou ao desenvolvimento das sulfas, e a descoberta da penicilina por Fleming (1929) representaram o grande marco em todos os tempos na constante luta do homem contra as doenças infecto-contagiosas. Neste período iniciava a era da quimioterapia antimicrobiana, que foi seguida pela busca e descoberta de novos fármacos efetivos e que estendia o tratamento à TB, até então rebelde ao tratamento com sulfanilamida e penicilina e, também, pelo otimismo exagerado em relação a efetividade desses princípios ativos como meio de controle das doenças (Santos, 1996).

A resistência aos antimicrobianos em organismos previamente sensíveis ocorre sempre que os antibióticos são usados para o tratamento de doenças infecciosas em humanos e animais. Com o aumento do uso de antibióticos, incluindo o mal uso, a resistência tem surgido em todos os tipos de microrganismos – incluindo o *M. tuberculosis* – criando novos desafios para o controle das doenças infecciosas.

A resistência apresentada pelo *M. tuberculosis* aos antibióticos é devido à mutações espontâneas em alguns genes do bacilo. O tratamento com um único fármaco – devido ao suplemento irregular do fármaco, prescrição inapropriada, ou baixa adesão

ao tratamento – reprime o crescimento de linhagens sensíveis ao fármaco, mas permite a multiplicação de linhagens resistentes.

As linhagens resistentes a vários fármacos simultaneamente, denominadas MDR, apresentam resistência a pelo menos dois dos mais importantes fármacos, INH e RMP. Os pacientes infectados com linhagens MDR são extremamente difíceis de curar, sendo necessário usar um tratamento muito mais tóxico e de maior custo.

As epidemias de TB MDR em pacientes infectados com HIV nos Estados Unidos e na Europa têm chamado a atenção pelo surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes aos agentes antimicobacterianos, que levam a altas taxas de mortalidade (Sepkowitz *et al*, 1995).

A resistência aos fármacos antiTB é uma ameaça significativa no controle da TB, porque há poucos fármacos eficazes disponíveis contra o *M. tuberculosis*. A transmissão de linhagens resistentes a dois dos mais importantes fármacos, INH e RMP, pode ter sérias repercussões na epidemiologia e controle da TB. Os pacientes infectados com linhagens resistentes a múltiplos fármacos têm menos chance de cura, e também sofrem com a maior toxicidade dos outros esquemas de tratamento (esquemas 2 e 3). Em um estudo americano foi demonstrado que houve falência de tratamento em 35% dos 171 pacientes HIV positivos com TB MDR, apesar de receberem tratamento direcionado para linhagens resistentes e individualizado (WHO, 1997).

2.2.2. Estudo realizado pela OMS e IUATLD

Entre 1994 a 1997, a OMS junto com IUATLD (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease) realizou um projeto global visando avaliar os níveis de resistência aos fármacos antiTB, abrangendo 35 países em 5 continentes. O objetivo do projeto foi medir a prevalência da resistência aos fármacos antiTB em vários países, utilizando métodos padronizados e fazendo uma correlação entre o nível de resistência e o controle do tratamento utilizado nestes países (WHO, 1997).

Os principais achados deste estudo relacionados com a resistência primária, isto é, de casos sem tratamento prévio, foi que a resistência a um fármaco qualquer variou de 2% (República Tcheca) a 41% (República Dominicana), com uma média de 10,4%. A resistência primária aos 4 fármacos testados (INH, RMP, EMB e SM) teve uma média de 0,2% dos casos (variação de 0 a 4,6%), enquanto a TB MDR mostrou uma média de 1,4% (variação de 0, no Quênia a 14,4% na Letônia).

A resistência adquirida, que reflete casos recentes de mal gerenciamento do tratamento, como esperado, demonstrou valores superiores à resistência primária. A resistência adquirida à qualquer um dos fármacos variou de 5,3% (Nova Zelândia) a 100% (Ivanovo Oblast - Rússia), com um média de 36%. A resistência aos 4 fármacos entre os pacientes previamente tratados teve uma média de 4,4% (variação de 0 a 17%). A média de prevalência da TB MDR adquirida foi de 13%, variando de 0% (Quênia) a 54% (Letônia). A figura 2 mostra um mapa com as taxas da prevalência adquirida nas regiões participantes da pesquisa no período de 1994 a 1997.

Este estudo demonstrou que no Brasil a resistência primária à RMP foi de 1,1% e à INH foi de 5,9%. Sendo que 8,6% dos casos estudados (n=2.095) demonstraram ser resistentes a um ou mais fármacos. Já a resistência adquirida, no Brasil, à RMP foi de 6,1% e à INH foi de 11,2%. Foram observados que 5,4% dos casos de resistência adquirida (n=793) eram resistentes à vários fármacos.

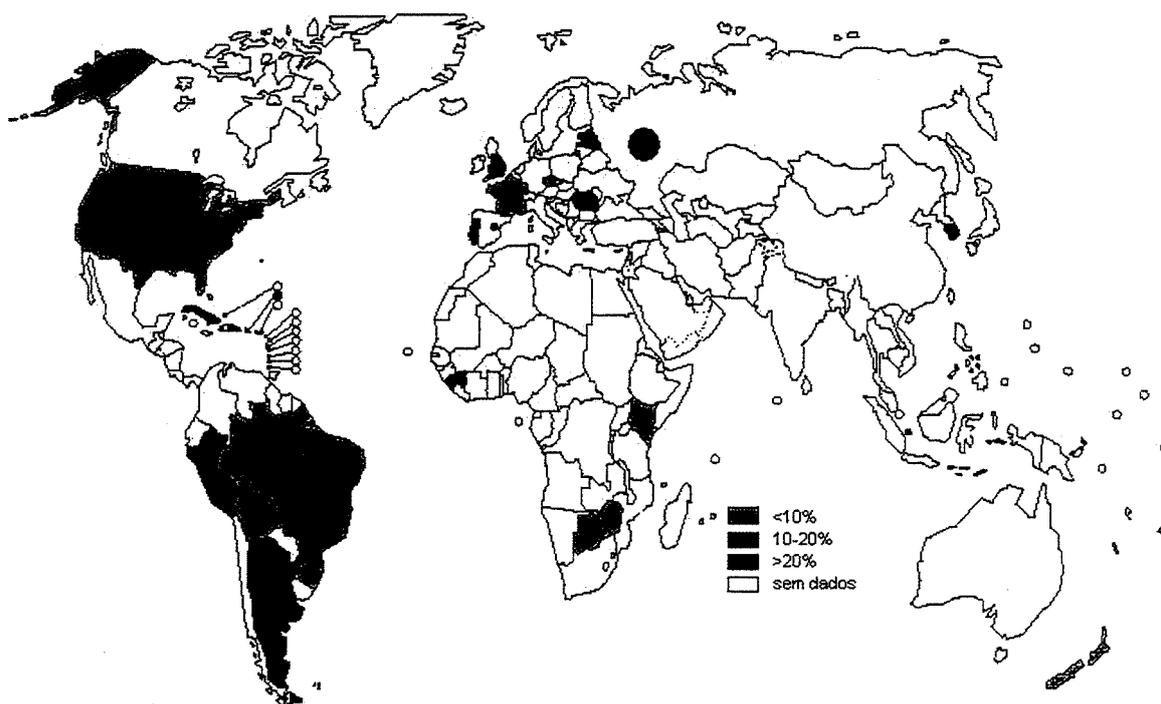


Figura 2. Prevalência da tuberculose MDR adquirida nos países e regiões pesquisadas, 1994-1997 (WHO, 1997).

2.2.3. Mecanismos e fatores associados com a resistência aos fármacos antiTB

A resistência apresentada pelo *M. tuberculosis* aos fármacos antiTB é uma amplificação artificial de um fenômeno natural. Diferente do que acontece em muitas bactérias, com o *M. tuberculosis* não há indicação de uma transferência horizontal de genes, isto é, aquisição de resistência por plasmídeos ou transposons. As linhagens selvagens de *M. tuberculosis* que nunca foram expostas aos fármacos antiTB raramente são resistentes, embora a resistência natural a fármacos específicos já tenha sido documentada para *M. bovis* (PZA).

As mutações que levam à resistência em muitos microrganismos, inclusive no *M. tuberculosis*, são alterações na seqüência do DNA bacteriano que se refletem nas proteínas envolvidas com a ligação aos fármacos. Essas mutações podem ser divididas em pontuais, quando apenas um nucleotídeo é alterado na seqüência do DNA, inserção ou deleção de bases ou seqüências de DNA.

2.2.3.1. *Frequência de mutações espontâneas em M. tuberculosis*

Durante a multiplicação bacteriana, a resistência aos fármacos antiTB desenvolve-se espontaneamente e com uma frequência definida (tabela 2). As mutações genéticas do *M. tuberculosis* que levam a resistência à rifampicina ocorrem numa taxa de 10^{-10} por divisão celular e levam a uma prevalência estimada de 1 em cada 10^8 bacilos, em ambiente sem o fármaco. A taxa para INH é de aproximadamente 10^{-7} a 10^{-9} , resultando em resistência em 1 a cada 10^6 bacilos (Grange, 1990). É comum ter nas cavidades uma população micobacteriana maior que 10^7 (Canetti, 1965). Assim, a “resistência genética” ocorre na ausência da exposição antimicrobiana, mas é diluída pela maioria das micobactérias sensíveis. A presença de antimicrobianos fornece uma pressão seletiva para os organismos resistentes tornarem-se predominantes, especialmente em pacientes com uma grande carga de bacilos, isto é, com uma extensa lesão cavitária (WHO, 1997).

Tabela 2. Características dos principais fármacos antiTB (WHO, 1997).

	<i>Ano de introdução</i>	<i>Atividade antiTB</i>	<i>NS/MIC*</i>	<i>Alvo molecular</i>	<i>Genes envolvidos na resistência</i>	<i>Taxa de mutação**</i>	<i>Resistência natural</i>	<i>Custo</i>
Fármacos de Primeira Linha								
Isoniazida	1952	++++	100	Síntese do ácido micólico	<i>inhA</i> <i>katG</i>	10^{-8}	1 em 10^9	Baixo
Rifampicina	1965	++++	100	RNA polimerase (subunidade β)	<i>rpoB</i>	10^{-10}	1 em 10^8	Médio
Pirazinamida	1970	+++	5 a 10	?	<i>pncA</i>	10^{-3}	1 em 10^7	Médio
Estreptomicina	1944	+++	30	Proteínas ribossomais	<i>rpoL, rrs, rrsA, S12</i>	10^{-8}	1 em 10^7	Alto
Etambutol	1968	++	3 a 4	Polissacarídeos da parede celular	<i>embA, B, C</i>	10^{-7}	1 em 10^5	Médio
Fármacos de Segunda Linha								
Etionamida	1966	+++	5		?	10^{-3}	?	Médio
Canamicina/ Amicacina	1957	+++	30	Proteínas ribossomais	?	10^{-6}	?	Alto
Cicloserina	1955	++	3 a 4	Síntese da parede celular	?	10^{-10}	?	Alto
Ácido p-aminosalicílico	1946	+	100	Biossíntese de folatos	?	10^{-8}	?	Alto
Ofloxacina	1987	++		DNA girase	<i>gyrA e B</i>	?	?	Alto

* NS/MIC: proporção dos níveis sanguíneos pela concentração mínima inibitória. ** Taxa de mutação por divisão celular nos genes responsáveis pela resistência aos fármacos.

A exposição a um único fármaco – devido ao fornecimento irregular do fármaco, prescrição inapropriada ou baixa adesão ao tratamento – reprime o crescimento de linhagens sensíveis àquele fármaco mas permite a multiplicação de linhagens resistentes (resistência adquirida). Podendo ocorrer a subsequente transmissão de alguns bacilos para outras pessoas, que podem ficar doentes (resistência primária). A figura 3 demonstra como pode ocorrer o desenvolvimento e a transmissão da TB MDR. Todos os fármacos ativos contra *M. tuberculosis* induzem a resistência, e a droga mais ativa é a mais provável indutora de resistência clínica (Canetti *et al.*, 1965).

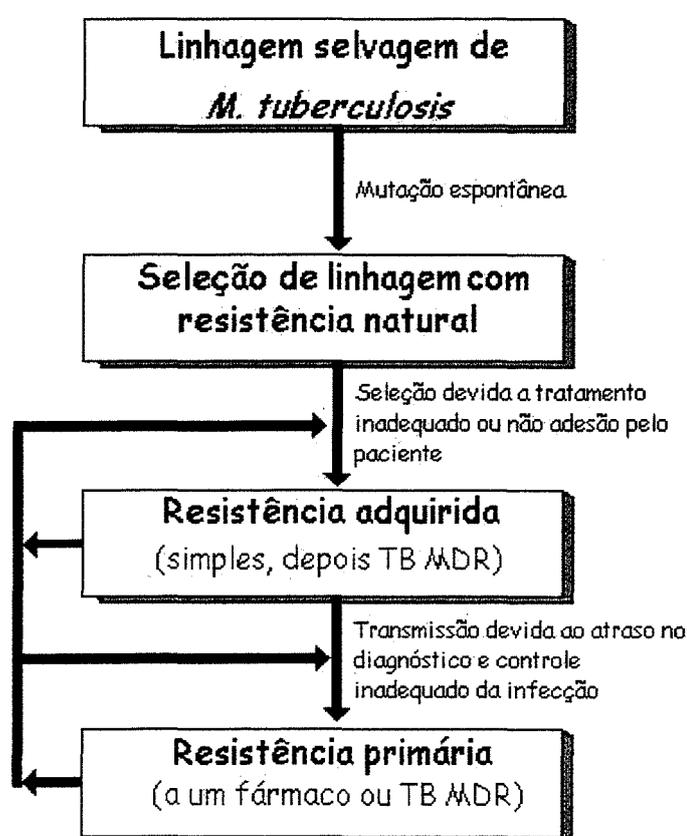


Figura 3. O desenvolvimento e transmissão da tuberculose resistente a um ou mais fármacos.

A resistência a múltiplos fármacos devido a mutações espontâneas é praticamente impossível, pois não há um único gene envolvido na MDR e as mutações resultantes em resistência a vários fármacos surgem independentemente. Por exemplo, a probabilidade de uma mutação espontânea resultar em resistência à INH e RMP é o produto das probabilidades individuais, isto é, 1 em 10^{14} ($10^6 \times 10^8$). Este é um fato

racional para o regime de múltiplos fármacos no tratamento da TB. Entretanto, em uma população bacteriana já resistente à INH, pode ocorrer mutação espontânea resultando na resistência a RMP em alguns bacilos. Uma seqüência similar pode levar à resistência a outras combinações de fármacos, e eventualmente a todos os medicamentos antiTB do esquema 1 de tratamento.

2.2.4. Fatores associados com o desenvolvimento da resistência

O surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistente a vários fármacos na população está associado com vários problemas, incluindo fatores relacionados com o paciente e com o sistema de saúde. Em muitos países, os fatores que afetam negativamente o programa incluem a falta de um regime terapêutico padronizado, baixa implementação, escassez no fornecimento dos fármacos em áreas com inadequados recursos ou instabilidade política. O uso de fármacos antiTB de baixa qualidade é uma preocupação adicional.

O desenvolvimento de resistência pode envolver uma seleção inapropriada no regime terapêutico, algumas vezes devido o desconhecimento de um tratamento anterior, a ignorância sobre a importância de regimes padronizados e erros como prescrição de um único fármaco. Finalmente, a não adesão do paciente ao tratamento prescrito contribui para o desenvolvimento da resistência aos fármacos. Outro fator que está sendo associado é a co-infecção HIV e TB (WHO, 1997).

E por último, o elemento crucial no surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes é a ausência de um sistema organizado para assegurar um rápido diagnóstico, um tratamento eficiente e uma supervisão dos casos de TB. Por esta razão, o nível de resistência aos fármacos antiTB em uma população é um indicador do Programa Nacional de TB (WHO, 1997).

2.2.5. Mecanismos da resistência em *M. tuberculosis*

O aumento do problema da resistência aos fármacos tem levado a um maior interesse em estudar os determinantes genéticos e os mecanismos de resistência aos fármacos apresentados pelo *M. tuberculosis*.

2.2.5.1. Resistência à isoniazida

Os mecanismos genéticos determinantes da resistência à INH parecem ocorrer em diferentes níveis: (i) bloqueio da ativação da droga, relacionado com o gene *katG*, (ii) inativação do intermediário tóxico da INH, atividade associada com o gene *ahpC* e (iii) bloqueio da biossíntese do ácido micólico (*inhA* e *mabA*).

As deleções no gene *katG*, que codifica uma catalase e uma peroxidase no cromossomo do *M. tuberculosis* é associada mais frequentemente com a resistência à INH (Zhang *et al.*, 1992). As mutações em um outro gene, o *inhA*, envolvido com a biossíntese de ácido micólico, resultam em menor nível de resistência à INH no *M. tuberculosis* (Banerjee *et al.*, 1994).

2.2.5.2. Resistência à estreptomicina

A resistência à estreptomicina está relacionada com os genes *rrs*, que codifica o rRNA 16S, e *rpsL*, codificante da proteína ribossomal S12 (Finken *et al.*, 1993). Estudos mostram que as substituições de aminoácidos na proteína S12 afetam a estrutura altamente ordenada do rRNA 16S e impedem as interações entre rRNA 16S e paromicina, um análogo da estreptomicina (Allen & Noller, 1989).

2.2.5.3. Resistência à rifampicina

A rifampicina tem ação bactericida altamente eficiente contra o *M. tuberculosis*, sendo um dos componentes chave no tratamento da TB. O mecanismo de ação da rifampicina e de resistência a esse fármaco em *E. coli* vem sendo extensivamente estudado (Gale *et al.*, 1981; McClure & Cech, 1978). A rifampicina liga-se na subunidade β da RNA polimerase resultando na inibição da transcrição (Gale *et al.*, 1981; McClure & Cech, 1978). Um mecanismo de ação similar foi demonstrado em *M. smegmatis* (Levin & Hatfull, 1993).

Entretanto, se a cadeia de RNA está em alongamento, a reação de polimerização torna-se insensível à presença da rifampicina. A inibição da síntese do RNA se dá através do bloqueio estérico da translocação da extremidade 5' do RNA existente. A ação ocorre na transcrição e impede a translocação do nucleotídeo, impedindo a síntese do RNA (Lal & Lal, 1994).

Chertov *et al.* (1983) investigaram o modo exato de ação da rifampicina. Eles estudaram a ligação do fármaco na RNAP de linhagens de *E. coli* sensíveis e resistentes e observaram que o complexo formado pela rifampicina com a polimerase de linhagens resistentes possuía uma constante de dissociação superior ao do complexo formado com as linhagens sensíveis. Os pesquisadores também verificaram que o RNA tem sítios de ligação análogos para o fármaco. Os grupos hidroxilas no C₁₂ e C₂₃, que são essenciais para sua atividade antibiótica, coincidem com os grupos hidroxilas 3' e 5' da ribose do dinucleotídeo. Isto indica que ocorre bloqueio diretamente no produto da translocação. Eles observaram ainda, que o resíduo do ácido aspártico⁵¹⁶ na enzima RNAP faz uma ligação do seu hidrogênio com o C₂₃ da rifampicina (figura 4). Quando comparado com uma linhagem mutante de *E. coli* resistente à rifampicina, onde o resíduo de ácido aspártico⁵¹⁶ foi substituído pela valina, mostrou-se que a ligação da rifampicina com a enzima foi reduzida ou eliminada (Lal & Lal, 1994).

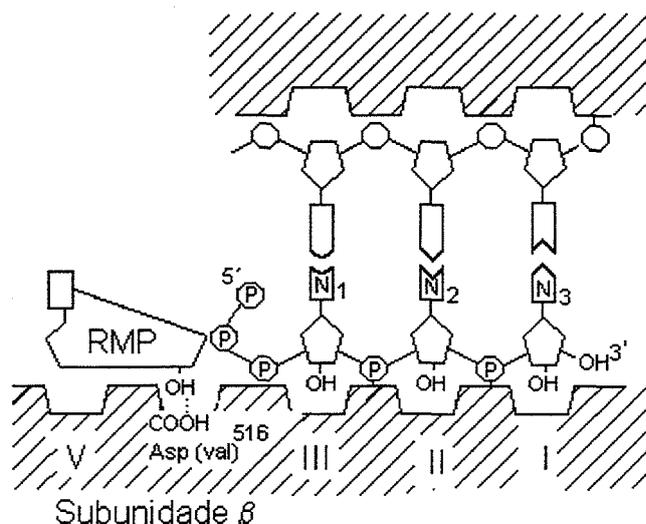


Figura 4. Modelo de inibição da RNA-polimerase pela rifampicina (Lal & Lal, 1994).

A reconstituição experimental com as subunidades em linhagens de *E. coli* sensíveis e resistentes à RMP demonstrou que a RNAP contendo as subunidades α e β' de linhagens resistentes e a subunidade β de linhagens sensíveis é sensível ao fármaco, enquanto a RNAP que contém as subunidades α e β' de linhagens sensíveis e a subunidade β de linhagens resistentes é resistente a rifampicina.

A partir dessas informações sobre a RNAP de *E. coli* buscou-se caracterizar o gene *rpoB* de *M. tuberculosis*. A resistência à rifampicina neste organismo também

mostrou-se relacionada com trocas na estrutura da subunidade β da RNA polimerase procariótica (Telenti *et al.*, 1993b, Miller *et al.*, 1994). A RNAP de isolados do complexo *M. avium* também é sensível à rifampicina, porém o mecanismo primário de resistência intrínseca parece estar relacionado com a impermeabilidade ao fármaco.

Telenti *et al.* (1993b) foram os primeiros a mostrar que a resistência à rifampicina em *M. tuberculosis* está relacionada com trocas, principalmente substituição de aminoácidos, dentro de uma região conservada do gene *rpoB*. Eles desenvolveram um teste rápido para detectar a resistência à rifampicina, onde mutações dentro do gene *rpoB* são detectadas pela técnica de amplificação por PCR de uma região de 157 pares de bases (pb), que contém a maioria dos sítios de mutação, e subsequente uso da técnica de SSCP (single-strand conformational polymorphism) (Telenti *et al.*, 1993a).

Willians *et al.* (1994) desenvolveram um método rápido, baseado no seqüenciamento de um produto de PCR de 305 pb. A região amplificada também está localizada no gene *rpoB*. Os autores também mostram que há um alto grau de similaridade nesta seqüência de nucleotídeos (90 a 100 %) entre *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium* e *M. africanum*. Foram analisadas 110 linhagens de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina, onde encontraram 16 diferentes tipos de mutação. Dentre os 16 tipos de mutação 9 foram idênticos àqueles que tinham sido descritos por Telenti *et al.* (1993a).

Uma compilação de dados disponíveis de muitos estudos indicam que 315 de 329 *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina (96%), isolados de pacientes epidemiologicamente não relacionados, tiveram 35 diferentes mutações de ponto, pequenas deleções ou inserções, localizados em uma região central de 81 pb no gene *rpoB* (região determinante da resistência à rifampicina [RDRR]), entre os códons 507 a 533, codificantes de 27 aminoácidos (Musser, 1995; Telenti *et al.*, 1993b; Kapur *et al.*, 1994; Heym *et al.*, 1994; Willians *et al.*, 1994; Kapur *et al.*, 1995).

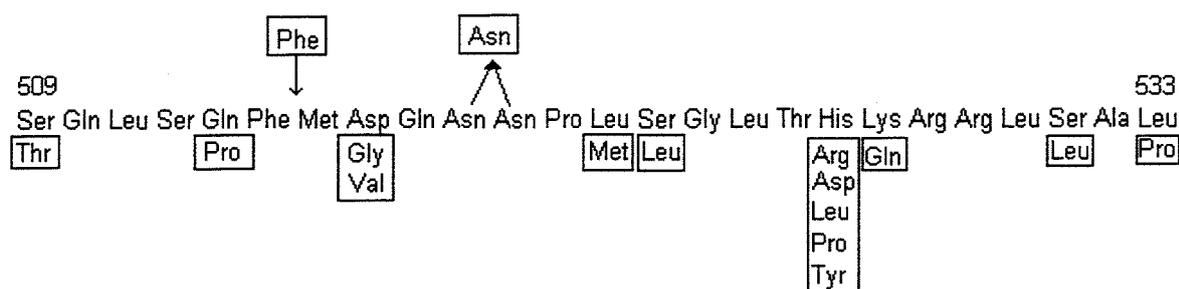


Figura 5. Aminoácidos substituídos nos códons 509 a 533 da subunidade β da RNAP de *M. tuberculosis*. As posições dos aminoácidos substituídos devido as mutações de ponto são mostradas nas caixas abaixo da seqüência. As posições dos aminoácidos substituídos ou ausentes devido a inserções ou mutações são mostradas nas caixas acima da seqüência (Willians *et al.*, 1994).

Destas linhagens analisadas, 43% apresentaram mutações de ponto no códon 531 (Ser) e 36% dos organismos apresentaram no códon 526 (His), que levaram a substituição dos aminoácidos. Os aminoácidos mais comumente substituídos foram Ser531Leu (42%) e His526Leu (23%) (Musser, 1995). O mecanismo de resistência não foi identificado em 4% dos isolados clínicos resistentes à rifampicina porque não foram detectadas mutações na região central de 81 pb nem em todo o gene *rpoB* seqüenciado.

Vários estudos publicados a partir de 1995 até 1998 confirmaram e ampliaram os princípios básicos desses achados. Caugant *et al.* (1995) analisaram a RDRR do *rpoB* em 66 *M. tuberculosis* isolados de pacientes do Moçambique, onde 41 isolados foram caracterizados resistentes à rifampicina pelo método radiorespiratório BACTEC. A maioria das linhagens resistentes (39 de 41) apresentaram mutações de ponto que resultaram em substituição de aminoácido, e a freqüência de distribuição dos códons afetados foi muito similar ao descrito em estudos anteriores.

Rinder *et al.* (1997) determinaram a distribuição das mutações no gene *rpoB* em 49 isolados resistentes à rifampicina obtidos em Serra Leoa e na Alemanha. A resistência à rifampicina foi determinada pelo método das proporções. E similar a outros estudos, mutações no códons 526 e 531 foram as mais comuns. Os investigadores também compararam as diferenças na freqüência de distribuição das mutações nos códons 516 e 526 nos isolados das duas áreas geográficas.

Recentemente, Escalante *et al.* (1998) realizaram a primeira análise genética molecular de linhagens resistentes à rifampicina em isolados obtidos em países da

América Latina. Os investigadores analisaram 19 linhagens sem relação epidemiológica obtidas no Peru e identificaram mutações na RDRR em 18 organismos. A maioria das linhagens tiveram substituição de aminoácidos nos códons 526 e 531.

PCR-SSCP e seqüenciamento do DNA foram usados para analisar a região central do gene *rpoB* em 32 isolados resistentes e 26 sensíveis à rifampicina obtidos na Coréia (Kim *et al.*, 1997). O teste de sensibilidade foi realizado pelo método de concentração absoluta. A maioria das mutações ocorreram nos códons 526 (37,8%) e 531 (24,4%). Duas mutações não descritas previamente foram identificadas nos códons 507 e 518. Em contraste a outros estudos, foi verificado uma alta freqüência de duplas mutações em códons separados (15,6%) e em um único codon (6,3% no codon 526; CAC →TGC, His→Cys).

Vários grupos vem realizando estudos com isolados de pacientes para compreender melhor a relação entre as concentrações mínimas inibitórias (MIC) e trocas estruturais na proteína RpoB (Kim *et al.*, 1997; Bodmer *et al.*, 1995; Ohno *et al.*, 1996). Estes estudos ampliam as investigações de Bodmer *et al.* (1995), que descreveram uma forte correlação entre as MICs para as rifamicinas relacionadas com certas variantes do gene *rpoB*. Em particular, as substituições nos aminoácidos localizados nas posições 526 e 531 conferem um alto nível de resistência à rifampicina, rifabutin e rifapentina. Ohno *et al.* (1996) analisaram a RDRR do *rpoB* em 40 isolados clínicos de *M. tuberculosis* obtidos no Japão. O teste de sensibilidade à rifampicina foi realizado pelo método de microdiluição e as linhagens com concentração mínima inibitória maior ou igual a 2 µg/ml foram consideradas resistentes. Treze linhagens com alto nível de resistência (MIC ≥ 64 µg/ml) apresentaram mutação nos códons 516, 526 ou 531. Em contraste, 21 organismos sensíveis não apresentaram trocas nestas posições. De seis linhagens com MICs entre 2 e 32 µg/ml, três apresentaram mutação nos códons 516 ou 526 e três linhagens não apresentaram mutação na RDRR.

A relação entre o grau de resistência à rifampicina e as mutações no gene *rpoB* foram também analisadas por Taniguchi *et al.* (1996) em 21 isolados de *M. tuberculosis* obtidos de pacientes no Japão. O teste de sensibilidade à rifampicina foi realizado pelo método das proporções ou pelo método de diluição. Vinte linhagens apresentaram alterações de aminoácidos nas RDRR e uma linhagem mostrou a substituição Ala381Val na região N-terminal da proteína RpoB. Isolados com mutações nos códons 513 (5%), 526 (33%) e 531 (43%) apresentaram alto nível de resistência (MIC ≥

50µg/ml). Em contraste, substituições de aminoácidos localizados na posição 514, 521 ou 533 resultaram em um baixo nível de resistência (MIC 12,5 µg/ml).

Achados similares foram descritos por Moghazeh *et al.* (1996), que testaram 24 isolados clínicos resistentes à rifampicina com mutações conhecidas no gene *rpoB* contra três derivados de rifamicina: rifampicina, rifapentina e um novo fármaco denominado KRM-1648, para correlacionar o nível de resistência com mutações específicas. Os testes de sensibilidade foram realizados pelo método de difusão em ágar. Como descrito em outros estudos (Bodmer *et al.*, 1995; Ohno *et al.*, 1996; Taniguchi *et al.*, 1996) linhagens com mutações nos códons 513, 526 e 531 mostraram alto nível de resistência à rifampicina (MIC > 32µg/ml), com exceção das linhagens com as substituições His526Leu ou His526Asn, as quais mostraram MIC de 8 e 16 µg/ml, respectivamente. Todas as linhagens que foram resistentes à rifampicina foram também resistentes à rifapentina, e os mesmos valores de MIC foram identificados.

Em contraste, KM-1648 mostrou-se mais eficiente que a rifampicina nas linhagens com quatro diferentes alterações genéticas. Estes achados sugerem a possibilidade teórica que o KM-1648 possa ser usado para tratar pacientes com *M. tuberculosis* que apresente certos tipos de mutações no gene *rpoB*. Porém, a análise de alelos mutantes no gene *rpoB* construídos através de estratégias moleculares, tem confirmado que algumas mutações na RDRR também são responsáveis pela resistência a KM-1648 (Willians *et al.*, 1998). E ainda, o estudo confirma que o KM-1648 sobrepõem a resistência à certas outras rifamicinas *in vitro*.

Em suma, as análises de aproximadamente 500 linhagens resistentes à rifampicina provindas de diversas origens mostram que 96% dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* têm mutações na região central do gene *rpoB* que alteram a estrutura primária da RpoB (figura 4). Essas mutações estão ausentes nos organismos sensíveis. Em geral, há uma forte correlação na substituição de aminoácidos específicos e MIC. As mutações *missense* nos códons 513, 526 ou 531 resultam em alto nível de resistência, enquanto trocas de aminoácidos nas posições 514 ou 533 usualmente resultam em baixo nível de resistência à rifampicina.

O mecanismo molecular de resistência em 4% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina que não têm trocas na RDRR é desconhecido. Recentemente foi demonstrado que a inativação da rifampicina por ribosilação em *M. smegmatis* é o

principal responsável no baixo nível de resistência à rifampicina, mas não há evidências que este processo participe na resistência aos fármacos em *M. tuberculosis* (Quan *et al.*, 1997).

2.2.6. Testes comerciais disponíveis

Alguns métodos genotípicos para a detecção das mutações na região RDRR estão disponíveis comercialmente, como o Inno LiPA Rif.TB (Innogenetics) e RNA-RNA mismatch assay (MisMatch Detect II – Ambion). O MisMatch é baseado na habilidade do RNA dupla fita resistir a digestão com RNase A. O DNA alvo é amplificado usando *primers* que incorporam, em direções opostas, os promotores da T7 RNA polimerase e da SP6 RNA polimerase, permitindo o RNA ser transcrito usando o produto de PCR como molde (Nash *et al.*, 1997). Uma linhagem sensível é também amplificada (H37Rv) pelos mesmos *primers*, porém com os promotores de T7 e SP6 incorporados de forma invertida à linhagem testada. O produto de PCR teste e o referência são combinados na reação de transcrição usando ambas as polimerases. O transcrito complementar dos produtos de PCR do teste e do referência são hibridizados e o híbrido resultante é tratado com RNase. Se houver qualquer mutação no transcrito teste não ocorrerá o pareamento correto com o transcrito teste, e assim ocorrerá a clivagem do híbrido em qualquer ponto. Os transcritos intactos e os produtos da clivagem são detectados por eletroforese em gel de agarose.

O LiPA é baseado no princípio de hibridização reversa em fase sólida onde oligonucleotídeos são imobilizados em localizações conhecidas numa tira de membrana e hibridizados com o produto de PCR marcado com biotina, sob condições rigidamente controladas. O híbrido formado é detectado colorimetricamente (De Beenhouwer *et al.*, 1995). Neste kit o gene *rpoB* é o alvo da amplificação e detecção. Cinco sondas que se sobrepõem foram desenhadas (S1 a S5) baseadas na sequência de uma linhagem selvagem. Então, quando uma mutação está presente na região alvo não ocorrerá a hibridização. A ausência da hibridização com uma das sondas é indicativo da presença de mutação que implica no genótipo resistente. São usados ainda mais quatro sondas que hibridizam com produtos que trazem as mutações mais frequentes, sendo assim designadas: R2 (Asp516Val), R4a (His526Tyr), R4b (His526Asp) e R5 (Ser531Leu). Uma sonda adicional, específica para identificar organismos pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* é utilizada. A figura 6 mostra uma representação esquemática do gene *rpoB* e as posições das sondas do kit Inno LiPA.

epidemiologia da TB, auxiliando no entendimento de fatores ambientais e sociais que influenciam na transmissão da TB.

Os avanços na biologia molecular e o conhecimento de seqüências polimórficas, permitiram o desenvolvimento de métodos altamente específicos para a tipificação de espécies bacterianas, possibilitando o estudo da epidemiologia molecular. A epidemiologia molecular é a integração de técnicas que podem investigar linhagens específicas de patógenos para entender a distribuição da doença na população.

O conceito de clone, para alguns objetivos, pode ser definido como culturas bacterianas isoladas independentemente e de diferentes origens em tempos diferentes, mas que mostrem idênticas características fenotípicas e genotípicas e que a mais provável explicação para esta identidade seja um recente ancestral comum. Uma técnica de tipificação ideal para detectar relação clonal entre linhagens deve ser rápida e logisticamente simples gerando um padrão discreto que seja estável com o passar do tempo. O grau de variabilidade clonal revela se a técnica é diversa o suficiente para que linhagens sem relação epidemiológica devam ser únicas, mas suficientemente estáveis que linhagens isoladas de pacientes infectados em uma determinada fonte e surto sejam idênticos (Small & van Embden, 1994).

Um protocolo, padronizado internacionalmente, permite a comparação de resultados obtidos em diferentes laboratórios do mundo e tem sido usado como uma poderosa ferramenta epidemiológica para tipificar e detectar o DNA do *M. tuberculosis* (van Embden *et al.*, 1993).

2.3.2. RFLP

O uso de marcadores genotípicos tem auxiliado no entendimento da dinâmica da transmissão da TB. O método de tipagem atualmente padronizado, denominado RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) é baseado no elemento de inserção IS6110, que é um elemento genético móvel presente em múltiplas cópias no complexo *M. tuberculosis* (McAdam *et al.*, 1990; Thierry *et al.*, 1990).

Um elemento de inserção é uma seqüência de DNA com uma estrutura definida que tem a habilidade de mover-se independentemente e inserir-se em vários locais no plasmídeo ou no cromossomo, mas não contém genes de resistência antimicrobiana nem genes envolvidos na patogenia. O IS6110 está presente em todos os isolados de *M. tuberculosis* e devido a sua mobilidade e número, a sua localização cromossomal varia

grandemente de linhagem para linhagem. Estas características permitiram o desenvolvimento da técnica de RFLP baseada nesse elemento de inserção, fornecendo um grande poder discriminatório e, na maioria dos casos, podendo distinguir com sucesso casos esporádicos e casos de TB relacionados epidemiologicamente (Small *et al.*, 1994). Entretanto, em alguns isolados, que possuem menos de 5 cópias do IS6110, o método tem baixo poder discriminatório e geralmente outras técnicas precisam ser usadas (Tenover *et al.*, 1997).

O RFLP é baseado na análise de *Southern blot* resultante da clivagem do DNA cromossomal, usando enzimas de restrição, cujo produto é separado utilizando gel de agarose em eletroforese convencional. Os fragmentos de DNA após separados são transferidos para uma membrana de náilon que é hibridizada com uma sonda marcada química ou radioativamente. As variações no número e tamanho dos fragmentos detectados na hibridização são referidos como RFLPs (Tenover *et al.*, 1997).

A TB ativa desenvolve-se a partir de uma infecção recentemente adquirida (doença primária ou rapidamente progressiva) ou a partir da reativação de uma infecção adquirida no passado. Ambos os padrões de doença ocorrem, mais freqüentemente em pessoas infectadas pelo HIV. Nos Estados Unidos e no Oeste Europeu, que são áreas com incidência de TB relativamente baixas, a doença em pacientes infectados com o HIV é resultante de infecção recente (Small *et al.*, 1994). Entretanto, a freqüência relativa da doença primária *versus* reativação em áreas com alta taxa de TB e AIDS, como no Brasil, ainda não está determinada. Em estudos baseados na população, especialmente em setores urbanos, os pacientes com TB, dos quais são isolados padrões únicos de RFLP, são considerados casos de reativação da TB, enquanto aqueles pacientes com isolados que compartilham padrões de RFLP indiferenciáveis são considerados como pertencentes ao mesmo *cluster*, representando a doença recentemente adquirida (Small *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1996; Ferrazoli *et al.*, 2000).

Vários autores têm mostrado que quando há suficiente diversidade genética na população, encontrar um grupo de indivíduos infectados com linhagens de *M. tuberculosis* que tenham o mesmo padrão de RFLP, é fortemente sugestivo de que este grupo está epidemiologicamente relacionado, tendo sido infectados entre si ou a partir de uma fonte comum (Ferrazoli *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 1999; Kubin *et al.*, 1999; Bifani *et al.*, 1996; Alito *et al.*, 1999).

A interpretação dos diferentes padrões de RFLP é uma tarefa bastante delicada. Os estudos iniciais usando IS6110 para tipificação assumiram que padrões que diferem em apenas uma banda representavam linhagens geneticamente e epidemiologicamente diferentes. Entretanto, dados mais recentes indicam que os padrões de IS6110 de isolados representam um *cluster* definido de casos de *M. tuberculosis* quando diferem em uma única banda no perfil de RFLP (Tenover *et al.*, 1997).

2.3.3. Etiologia do aparecimento da MDR

Se a diversidade no RFLP pode representar doença recentemente adquirida, pode também auxiliar na explicação de porque as linhagens MDR estão surgindo e ajudar nos esforços de controle. A MDR pode resultar do surgimento da resistência em uma linhagem original, em paciente que não adere ao tratamento, ou de uma disseminação clonal de uma linhagem específica.

A demonstração de significativa diversidade de padrões de RFLP entre as linhagens MDR implica que estão surgindo de diversos pacientes que não aderiram ao tratamento e sugere medidas de controle específicas como DOTS. Entretanto, uma limitada diversidade de RFLP entre as linhagens MDR sugere que a disseminação clonal de poucas linhagens está ocorrendo como resultado de um atraso no diagnóstico e/ou tratamento dos casos infecciosos, sendo que o foco de controle deve ser uma melhora na busca de casos e tratamento (Small & van Embden, 1994).

Dados preliminares sugerem que a maioria das linhagens MDR em São Francisco tem um único padrão de RFLP e que a diversidade entre as linhagens MDR de Nova York pode ser limitada (Bloom, 1994). Isto é consistente com a observação de que a busca de casos e tratamento são problemáticos na cidade de Nova York (Burdney & Dobkin, 1991). Esses fatos demonstram a urgência de desempenhar um bom controle da TB na população.

3. Justificativa e Objetivos

Considerando que o Brasil ocupa o 10º lugar entre os 22 países que são responsáveis por 80% dos casos estimados de TB no mundo (Brasil, 1999) e que quase a metade dos casos de TB no Brasil ocorre na região sudeste foram escolhidos os estados do Rio de Janeiro e São Paulo, juntamente com estado do Rio Grande do Sul, para assim ampliar as informações sobre as características das linhagens de *M. tuberculosis* isolados de pacientes dessas regiões. Os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Analisar o gene *rpoB* em linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes e sensíveis à rifampicina, isolados de pacientes provindo dos estados do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo;
- ✓ Caracterizar as mutações mais frequentes nesses isolados envolvidas com a resistência à rifampicina;
- ✓ Compreender a dinâmica da transmissão das linhagens MDR através da técnica de RFLP;
- ✓ Buscar observar se há associação entre os diferentes padrões de RFLP e as mutações no gene *rpoB*;
- ✓ Avaliar a eficiência de um teste comercial em detectar as mutações relacionadas com a resistência à rifampicina, quando aplicado em isolados de *M. tuberculosis* obtidos de pacientes brasileiros.

4. Materiais e métodos

4.1. Isolados de *Mycobacterium tuberculosis* utilizados

Os isolados de *M. tuberculosis* analisados foram obtidos de três estados do Brasil (RS, SP e RJ). Cinquenta e quatro isolados são provenientes do Serviço de Bacteriologia do Laboratório Central (Lacen) do Rio Grande do Sul. O material clínico dos pacientes foi coletado no período de 1995-1998. O Centro de Referência Professor Hélio Fraga, localizado no Rio de Janeiro, forneceu 26 isolados de *M. tuberculosis*, isolados na sua grande maioria no ano de 1998. Foram obtidos primeiramente vinte isolados do estado de São Paulo dos quais 9 provinham do Instituto Adolfo Lutz e 11 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Em um segundo momento foram obtidos mais 32 isolados de *M. tuberculosis* no Instituto Adolfo Lutz. Todas as amostras de São Paulo foram isoladas durante os anos de 1997 e 1998.

Os pacientes tiveram TB pulmonar e eram suspeitos de estarem infectados com organismos resistentes aos fármacos com base na falência clínica após o tratamento com os agentes da primeira linha. Os pacientes foram selecionados aleatoriamente e provêm de diferentes centros de saúde e não tinham associação epidemiológica conhecida. Os espécimes de escarro foram descontaminados com solução de NaOH 4% e cultivados primariamente em meio de cultura Ogawa (anexo 8).

4.2. Cultura e teste de sensibilidade

A cultura primária foi realizada no meio de cultura Ogawa. O teste de sensibilidade foi determinado no meio Löwestein-Jensen segundo o Método das Proporções descrito por Canetti *et al.* (1969). No teste de sensibilidade foram usados os seguintes fármacos: rifampicina (40 µg/ml), isoniazida (0,2 µg/ml), estreptomicina (4 µg/ml), etambutol (2 µg/ml), pirazinamida (100 µg/ml), etionamida (20 µg/ml). As proporções críticas da população bacteriana indicadores de resistência foram as seguintes: INH = 1%, RMP = 1%, SM = 10%, EMB = 1%, ETH = 10% e PZA = 10%. Todas os isolados foram niacina positiva, e, definidas como MDR as resistentes pelo menos à isoniazida e rifampicina.

4.3. Preparação da amostra e reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.3.1. Extração do DNA cromossomal

O DNA cromossomal foi isolado conforme descrito por van Soolingen *et al.* (1994). Algumas colônias foram ressuspensas em TE e aquecidas a 80°C por 20 min para inativar as células. Foi adicionado lisozima para uma concentração final de 1 mg/ml e o tubo foi incubado por 1 h a 37°C. Foram adicionados 70 µl de SDS 10% e 6 µl de proteinase K (10 mg/ml) e a mistura foi incubada por 10 min a 65°C. Um volume de 100 µl de NaCl 5 M e 100 µl de CTAB foi adicionado à mistura e agitado rapidamente e então incubado por 10 min a 65°C. Um volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico foi adicionado, e a mistura foi agitada por 10 segundos. Após a centrifugação por 5 min a 12.000 rpm a fase aquosa foi transferida para outro tubo. A essa fase aquosa foi adicionado 0,6 volume de isopropanol para precipitar o DNA. Após, a solução foi resfriada por 30 min a -20°C e centrifugada por 15 min a 12.000 rpm, seguida de uma lavagem do precipitado com etanol 70%. O precipitado foi secado a temperatura ambiente e dissolvido em 20 µl do tampão TE 0,1 X.

4.3.2. Oligonucleotídeos para a reação de PCR

Os oligonucleotídeos foram baseados na região determinante de resistência à rifampicina no gene *rpoB* (número de acesso no GenBank U12205). Para amplificar a região de 157 pb, que codifica os aminoácidos 511 a 533 (sistema numérico de *E. coli*), foram utilizados os oligos descritos por Telenti *et al.* (1993a), denominados Rif1 (5'GGTCGCCGCGATCAAGGAGT) e o Rif2 (5'GGAGGTCCGCGACGTTGC)

Para amplificar uma região de 600 pb no gene *rpoB* foram utilizados os oligonucleotídeos Seq1 (5'CGAGGGTCAGACCACGAT) e Seq2A (5'CGATCGGCGAATTGGCCT), baseados na sequência publicada por Miller *et al.* (1994) (número de acesso no Genbank L27989).

4.3.3. Reação de PCR

A reação de PCR para amplificar o fragmento de 157 pb foi padronizada utilizando-se 10 ng de DNA de *M. tuberculosis* extraído de culturas, 10 pmol dos primers Rif 1 e Rif 2 em 50 µl de reação de mistura (50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl

(pH 8.4), 3 mM MgCl₂, 200 μM de cada desoxinucleosídeo trifosfato e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Cenbiot/UFRGS). O produto de PCR, com aproximadamente 157 pb, foi visualizado em gel de agarose 1,5% contendo 0,5 μg/ml de brometo de etídeo, por iluminação com UV.

O fragmento de 600 pb foi amplificado em uma reação de mistura de 50 μl nas mesmas condições descritas acima, porém usando 20 pmol de cada *primer* (Seq1 e Seq2A).

4.3.4. Condições da reação

A reação de PCR para a obtenção do produto de 157 pb foi realizada em termociclador (MiniCyclr™, M. J. Research Inc) e consistiu em uma pré-desnaturação a 95°C por 3 min; a seguir uma nova desnaturação a 95°C por 1 min; anelamento a 65°C por 1 min e extensão a 72°C por 1,5 min durante 25 ciclos. Após a conclusão dos 25 ciclos uma nova extensão a 72°C por 4 min. O produto de 600 pb foi obtido nas mesmas condições descritas acima, porém a temperatura de anelamento foi de 62°C.

4.3.5. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Foi utilizado um sistema de eletroforese horizontal sendo que a concentração do gel de 0,8% foi utilizada para avaliar a extração do DNA cromossomal e de 1,5% para analisar o produto amplificado. Os géis, medindo 14 cm x 12 cm x 0,5 cm, foram preparados em TEB 1X. A voltagem aplicada durante a corrida eletroforética variou de 20 V a 100 V.

O marcador de peso molecular utilizado durante as corridas eletroforéticas foi "100 bp DNA Ladder" (Gibco BRL).

4.4. Seqüenciamento manual

A região do gene *rpoB* envolvida na resistência à rifampicina foi analisada pela técnica de seqüenciamento usando diretamente o produto de PCR.

4.4.1. Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada com "Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit" (Amersham Life Science, Ohio, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas 10 ng do fragmento de

PCR, purificado com a coluna MicroSpin™ Columns (Pharmacia Biotech) e 2 pmol dos *primers* Rif 1 ou Rif 2.

A reação foi feita em termociclador (MiniCycler™, M. J. Research Inc) com as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 30 s; o anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min, por 50 ciclos.

4.4.2. Preparo dos géis de seqüenciamento

Para o seqüenciamento manual utilizou-se o sistema de cubas e placas da GIBCO BRL, modelo AS. O gel para o seqüenciamento a 8% foi preparado para um volume final de 50 ml e continha 21 gramas de uréia, 9,5 ml da solução de acrilamida 42%/bisacrilamida 1,8%, 10 ml de TEB 5x. A polimerização da acrilamida era promovida pela adição de 130 µl de persulfato de amônio (APS) 25% e de 30 µl de TEMED.

4.4.3. Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida

Utilizou-se um sistema de eletroforese vertical para a resolução dos fragmentos de DNA marcados radioativamente em diferentes reações de seqüenciamento. Aplicou-se potência constante de 55 W, variando-se tanto a intensidade da corrente elétrica quanto a voltagem. O tampão de corrida, TEB 1X, foi o mesmo tampão utilizado no preparo do gel de poliacrilamida.

O tempo de corrida foi de aproximadamente de 2h. A eletroforese era monitorada visualmente pela migração dos corantes xileno cianol e azul de bromofenol presentes nas amostras aplicadas. O gel era submetido a secagem através de vácuo e temperatura (Gel Dry – Life Thecnology), e a seguir exposto ao filme de raio X.

4.5. Clonagem de um fragmento maior do gene *rpoB*

Nos isolados em que não foram encontradas mutações na região de 157 pb foi seqüenciada uma região maior no gene *rpoB*. Para isso foi utilizado o protocolo “TA Cloning® Kit” (Invitrogen), que permite a clonagem de um produto de PCR em poucas etapas. O vetor pCR®2.1 (Invitrogen) apresenta um marcador de resistência à ampicilina, possibilitando a seleção de bactérias efetivamente transformadas através do crescimento de uma cultura bacteriana na presença do antibiótico.

A identificação das colônias portadoras do clone recombinante efetuou-se de forma visual, quando crescidas na presença de IPTG e do agente cromogênico X-Gal: colônias bacterianas que foram transformadas com o clone recombinante apresentaram-se brancas, enquanto que aquelas transformadas apenas com o vetor religado mostraram-se azuis.

4.5.1. Obtenção do produto de PCR, ligação no vetor e clonagem

O produto de PCR foi gerado utilizando os *primers* (2.3.2) e as condições (2.3.4) já descritas, acrescentando uma etapa final de extensão de 10 min, levando a maior adição de adenosinas para favorecer a ligação no vetor utilizado.

A ligação do produto de PCR no vetor pCR[®]2.1 foi realizada com amplicon recente e conforme instruções do fabricante, sendo deixado pelo menos 4h a 14°C. A transformação foi realizada utilizando-se células de *E. coli* TOP10F'.

4.6. Seqüenciamento automático

A seqüência da região determinante de resistência à rifampicina também foi determinada por seqüenciamento em seqüenciador automático modelo ABI Prism 310 – Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O produto de PCR de 157 pb foi purificado usando o sistema de purificação por colunas (QIAquick[™] Spin – Qiagen). O plasmídeo contendo o inserto de 600 pb foi isolado utilizando colunas (QIAprep[®] Miniprep – Qiagen) e seqüenciado com os *primers* T7 e M13 reverso, nas condições descritas.

A reação de seqüenciamento foi realizada com BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). Foram usados 8 µl do produto de PCR ou 10 µl do plasmídeo, e, 3 pmol de *primer* (Rif 1/Rif 2 e T7/M13 reverso). Foram realizados 25 ciclos com as seguintes etapas: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C durante 4 min.

A purificação da reação de seqüenciamento foi realizada utilizando 2 µl de acetato de sódio 3,5 M (pH 4,6) 50 µl de etanol 95%. A seguir incubado em gelo durante 20 min, centrifugado 20 min a 13.000 rpm. Foram adicionados 250 µl de etanol 70% e agitado, seguida de centrifugação por 5 min. O precipitado foi deixado a temperatura ambiente até secar e dissolvido em tampão apropriado.

4.7. Números de acesso às seqüências de nucleotídeos

Os novos alelos encontrados neste estudo foram depositados no GenBank sob os números: AF143771, AF146567, AF147030, AF147031, AF147033, AF147034 (<http://www.ncbi.nih.gov/entrez./index.html>).

4.8. Teste das amostras usando protocolo comercial

Dentre os kits disponíveis comercialmente o Inno-LiPA Rif.TB (Innogenetics) foi utilizado para testar os isolados de *M. tuberculosis* deste estudo. O teste é baseado no princípio da hibridização de fase sólida reversa, onde o DNA alvo é amplificado usando *primers* biotinizados. O teste foi realizado na Fundação Oswaldo Cruz em 76 isolados, seguindo as instruções do fabricante disponíveis no manual do usuário. Para o *nested* PCR foram utilizados 10 ng do DNA dos isolados em 40 µl da reação de mistura contendo os *primers* externos do teste. Um µl do primeiro produto foi amplificado novamente usando *primers* internos, que eram biotinizados na porção 5'. Após análise em gel, o produto de PCR foi desnaturado e hibridizado com sondas de captura ligadas a uma membrana. A etapa de detecção de cor envolveu a adição do conjugado estreptoavidina ligada a enzima fosfatase alcalina. Os substratos cromogênicos (5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato e azul nitro tetrazolím) foram adicionados e na presença da fosfatase alcalina ocorreu a conversão em um produto insolúvel azul-violeta. Na interpretação dos padrões de bandas identificou-se a micobactéria como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* e a detecção das mutações que deveriam conferir resistência à rifampicina.

4.9. RFLP

Os isolados de *M. tuberculosis* foram tipificados de acordo com o método padronizado, descrito por van Embden *et al.* (1993). O DNA cromossomal foi isolado de cada amostra, conforme já descrito, e digerido com a enzima de restrição *PvuII*. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% nas dimensões de 20 cm x 25 cm x 0,5 cm e em baixa voltagem (35 V) para permitir uma melhor separação dos fragmentos.

4.9.1. Transferência para a membrana

Uma vez procedida a corrida eletroforética, os fragmentos de DNA foram transferidos para uma membrana de náilon (Hybond N, Amersham) utilizando equipamento para transferência a vácuo (Pharmacia Biotech), sendo as condições da transferência realizadas conforme instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA eram então fixados à membrana em forno a 80°C por 2 horas. A seguir, a membrana era pré-hibridizada por 1h em forno giratório a 42°C (Hybaid Instruments, Holbrook, NY).

4.9.2. Sonda e marcação

A sonda utilizada corresponde a um fragmento de 245 pb do IS6110, e foi obtida por PCR usando como DNA molde a linhagem referência H37Rv. Os *primers* para a sonda IS6110 foram os oligonucleotídeos INS-1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3') e INS-2 (5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3').

Para a marcação da sonda utilizou-se um método de marcação não-radioativo. Nesse sistema, ECLTM Direct System (“enhanced chemiluminescence”) (Amersham), a sonda de DNA é desnaturada e posteriormente ligada a um polímero de cargas positivas que se encontra complexado com a enzima peroxidase. Essa interação é estabilizada pela formação de ligações covalentes entre a enzima e o DNA através da adição de glutaraldeído.

4.9.3. Análise do RFLP

Neste método, o *Southern blot* foi realizado para determinar o número e o tamanho dos fragmentos de DNA cromossomal que hibridizam com uma porção do elemento de inserção IS6110. Os padrões de RFLP foram comparados visualmente e usando o software GelCompar (Versão 4.2, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Dois ou mais isolados foram definidos como pertencentes ao mesmo *cluster* se seus padrões de RFLP foram indistinguíveis. Um *cluster* na qual seu padrões de RFLP difere em apenas uma ou duas bandas de outro *cluster* foram considerados membros da mesma família (Tenover *et al.*, 1997). Os isolados que apresentaram padrões de RFLP distintos de todos os outros padrões identificados entre os isolados estudados foram considerados únicos ou sem *cluster*.

Como definido previamente, um padrão *cluster* isolado foi considerado representante de uma infecção recentemente adquirida, e um padrão sem *cluster* isolado

foi considerado representante de uma reativação de uma infecção adquirida no passado (Small, 1994).

5. Resultados

5.1. Teste de sensibilidade

Os isolados de *M. tuberculosis* foram testados pelo método das proporções frente aos seguintes fármacos: INH, RMP, ETH, EMB e PZA. Entre as amostras providas do Rio Grande do Sul, 38 foram consideradas resistentes à rifampicina (RMP^R) e 16 sensíveis (RMP^S). Vinte e cinco amostras obtidas no Rio de Janeiro foram classificadas como RMP^R e uma sensível RMP^S. Dentre as amostras obtidas em São Paulo 50 eram RMP^R e duas RMP^S. O perfil de sensibilidade de cada isolado está descrito na tabela 3.

Tabela 3. Perfil de resistência dos isolados de *M. tuberculosis* MDR obtidos no Brasil

Isolados ^a	Resistência ^b
RS7591, SP79, SP80 ^c	(R) RMP
SP16, SP17, SP18, SP24, SP26, SP27, SP28, RJ30, RJ32, RJ38, RS02, RS34, RS40, RS6562, RS6580, RS6756, RS6965, RS7084, RS7205, RS7242, RS7365, RS7484, RS7506, RS7543, RS8029, RS8142, RS8183, RS8187, SP58, SP62, SP64, SP65, SP67, SP73, SP75, SP77, SP82, SP83, SP84, SP85, SP86, SP87	(R) RMP, INH
SP22, SP23, SP25, RJ35, RJ53, RS28, RS36, RS6886, RS7753, RS8117,	(R) RMP, INH, SM
SP03, SP04, SP06, SP07, SP10, SP11, SP15, RJ39, RJ50, RS6565, RS8001, SP56, SP59, SP60, SP61, SP66, SP68, SP69, SP70, SP71, SP72, SP76	(R) RMP, INH, PZA
RS57, RS6782, RS7180, SP57	(R) RMP, INH, EMB
SP08, RJ41, RJ48, RS6573, SP66, SP81	(R) RMP, INH, SM, PZA
RJ44, RS7681, SP74	(R) RMP, INH, SM, EMB
SP13, RJ54, RS7704	(R) RMP, INH, PZA, ETH
RS7253, RS7256, RS7454	(R)RMP, INH, EMB, ETH
RJ49	(R) RMP, INH, SM, PZA, ETH
RS07	(R) RMP, INH, SM, EMB, ETH
RJ37, RJ40, RJ51, RJ52	(R) RMP, INH, PZA, EMB, ETH
RJ29, RJ31, RJ33, RJ34, RJ46, RJ47, RJ55	(R) RMP, INH, SM,PZA, EMB, ETH
Isolados ^d	
RJ36, RS5897, RS6577, RS6569, RS6513, RS6514, SP78, SP88	(S) RMP, INH, SM, EMB, ETH
SP19	(R) INH (S) RMP, EMB, ETH
RS16, RS20, RS21, RS7619	(S) RMP, INH, PZA, EMB
RS7594	(R) INH (S) RMP, SM, EMB, ETH
RS6587, RS6676, RS6748	(S) RMP, INH, SM, PZA, EMB,
RS61025	(S) RMP, INH, SM, PZA, EMB, ETH
RS8124	(R) INH (S) RMP, SM, PZA, EMB, ETH
RS8135	(R) INH, PZA (S) RMP, SM, EMB, ETH

- RS, isolados do estado do RS; RJ, isolados do estado do RJ; SP, isolados do estado de SP.
- RMP, rifampicina; INH, isoniazida; PZA, pirazinamida; SM, estreptomicina; EMB, etambutol; ETH, etionamida; R, resistente; S, sensível.
- Isolados resistentes apenas à rifampicina.
- Isolados sensíveis à rifampicina.

5.2. Amplificação das regiões genômicas de interesse

O DNA cromossomal de *M. tuberculosis* extraído de culturas foi utilizado para a reação de PCR. As condições da reação de PCR foram padronizadas conforme já descrito e a concentração de DNA foi estabelecida em 10 ng. A amplificação dos produtos foi confirmada em gel de agarose, como mostra a figura 7.

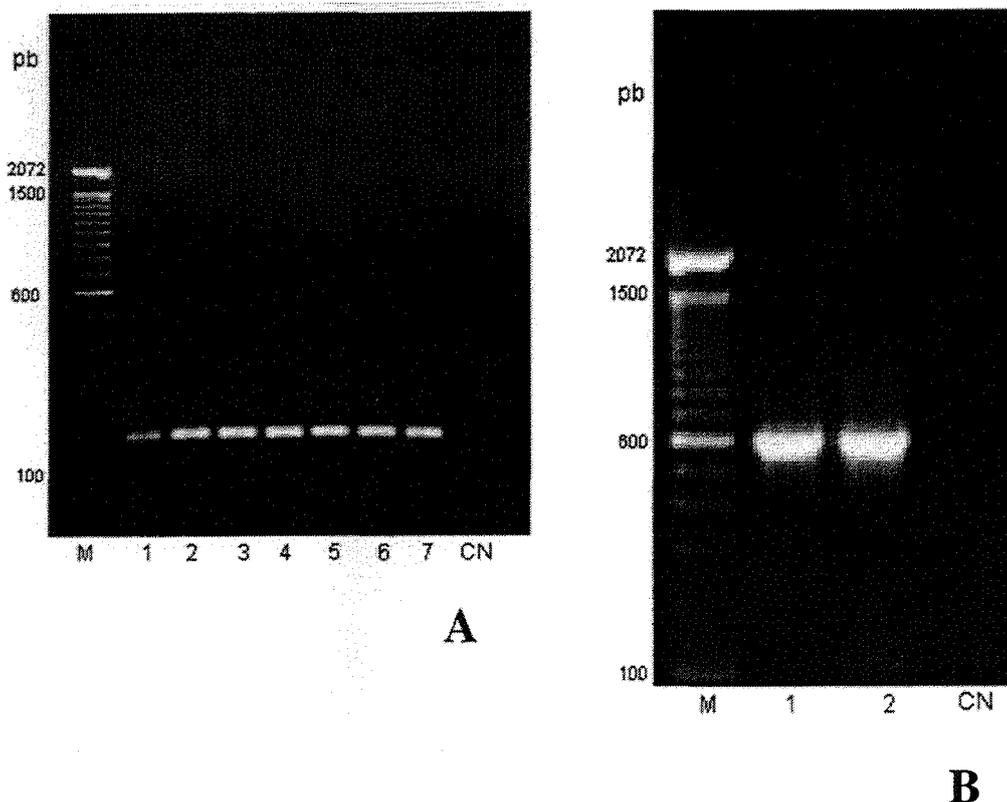


Figura 7. Análise eletroforética dos produtos de DNA obtidos pela amplificação de região do gene *rpoB* de *M. tuberculosis* de diferentes isolados. A) M: kb ladder 100 pb, 1-7: produto de 157 pb, CN: controle negativo; B) M: kb ladder 100 pb, 1-2: produto de 600 pb, CN: controle negativo.

5.3. Mutações encontradas no gene *rpoB*

A RDRR no gene *rpoB* seqüenciada nos isolados de *M. tuberculosis* mostrou distintas mutações na maioria dos isolados resistentes à rifampicina e nenhuma mutação nos isolados sensíveis, quando comparada com a seqüência da linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* publicada no GenBank sob o número de acesso L27989 (<http://www.ncbi.nlm.gov/htbin-post/Entrez>). No seqüenciamento manual foram utilizados dois distintos produtos de PCR para cada isolado. Em seqüenciador automático os isolados foram seqüenciados em ambas as direções. A linhagem H37Rv

de *M. tuberculosis* foi usada como controle das reações de seqüenciamento. Os tipos de mutações e a freqüência em que foram encontradas são descritas a seguir por estado.

5.3.1. Amostras do Rio Grande do Sul

Neste grupo foram seqüenciados 54 diferentes isolados, sendo que 38 eram resistentes à rifampicina. Foram observados 9 tipos de mutações dentro da região de 157 pb analisada. Todos os isolados apresentaram mutações de ponto, sendo que a mais freqüente foi observada no códon 531 (55%). O tipo mais freqüente de mutação que ocorreu nesse códon pode ser visualizado na figura 8. Mutações de ponto também ocorreram nos códons 526 (29%), 516 (8%) e 511 (3%). Em dezesseis amostras sensíveis à rifampicina e uma resistente não foram encontradas mutações na região analisada.

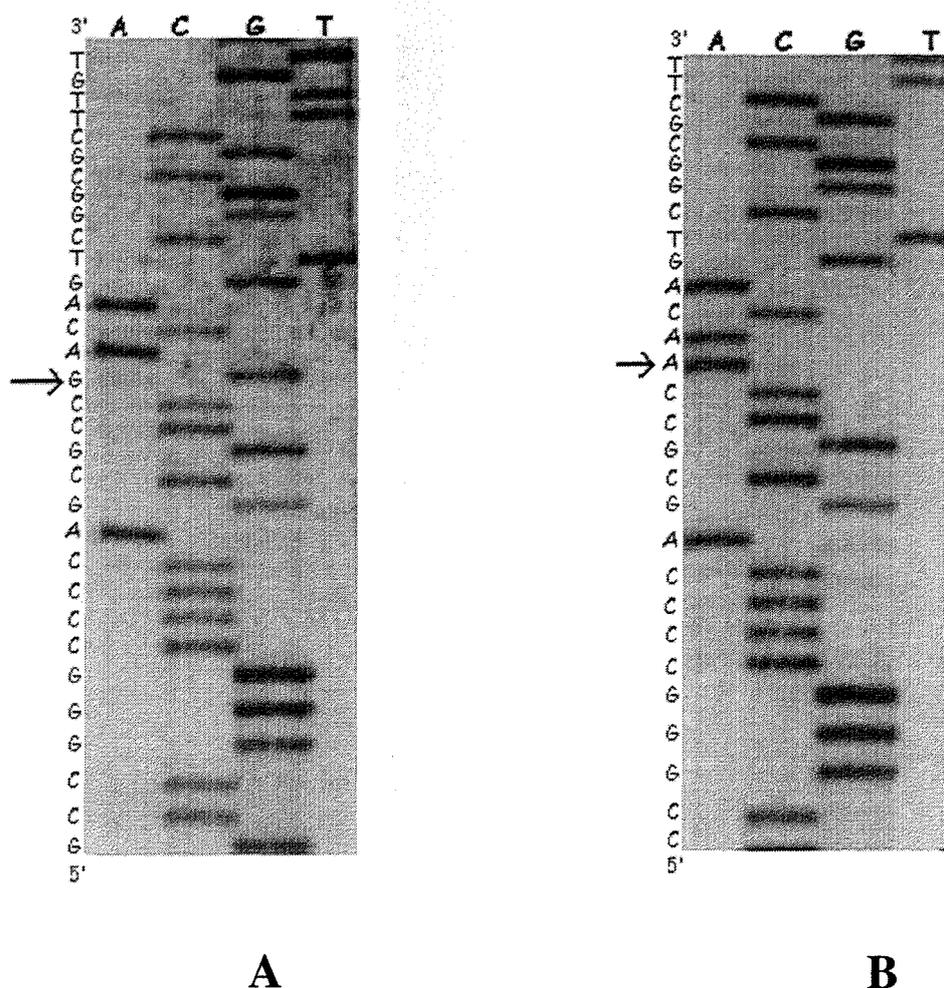


Figura 8. Auto-radiografia do seqüenciamento direto do produto de PCR. Análise de parte da seqüência do gene *rpoB*. A substituição no códon 531 de uma guanina (G) por uma adenina (A) está indicada por uma seta na seqüência mutante de uma linhagem resistente à RMP. A) linhagem selvagem. B) linhagem mutante.

5.3.2. Amostras de São Paulo

Em uma primeira fase foram analisadas 19 amostras RMP^R e uma amostra RMP^S. Estas amostras foram obtidas de dois diferentes lugares como mencionado previamente (3.1). No isolado sensível não foi observada nenhuma mutação. Nas amostras que apresentavam o fenótipo RMP^R foram detectadas 7 tipos de mutações de ponto, em 4 diferentes códons do gene *rpoB*. As mutações nos códons 531 e 526 foram as mais frequentes, mas também foram detectadas mutações nos códons 522 e 533. Diferentes tipos de mutações de ponto ocorreram no códon 526, sendo que uma delas pode ser observada na figura 9. Duas amostras apresentaram duas bases substituídas no mesmo códon. Em um isolado de *M. tuberculosis* com fenótipo RMP^R não foi observado nenhuma alteração na região do gene *rpoB* estudada.

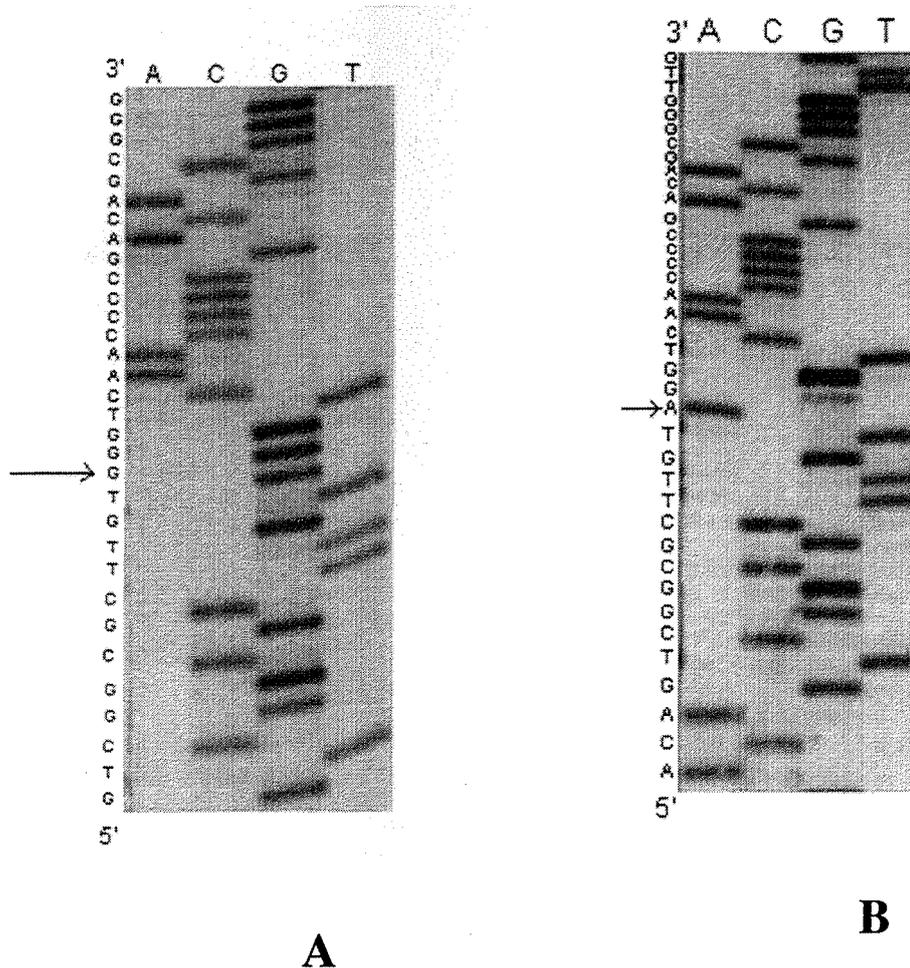


Figura 9. Auto-radiografia do seqüenciamento direto do produto de PCR. Análise de parte da seqüência do gene *rpoB*. A substituição no códon 526 de uma guanina (G) por uma adenina (A) está indicada por uma seta na seqüência mutante de uma linhagem resistente à RMP. A) linhagem selvagem. B) linhagem mutante.

Numa segunda etapa foram analisados mais 32 isolados, todos obtidos no Instituto Adolfo Lutz, sendo 30 RMP^R e 2 RMP^S. Foram observadas 7 tipos de mutações de ponto, sendo novamente a mutação no códon 531 a mais freqüente, seguida pelas mutações no códon 526, códon 516 e códon 533. A análise do seqüenciamento em alguns casos foi realizada usando o programa computacional DNASIS, que comparou a região por simples homologia, conforme mostra a figura 10.

DNASIS		10/11/99		Page 1			
Simple Homology Region [71980-2]							
No.	Target File	Mode	Key	Target	Overlap	Match	Percentage
1	RPOB	N	1	1281	154	126	81.81%
1	10	20	30	40	50	60	70
5'	CGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCC						

5'	CGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCC						
1281	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350
71	80	90	100	110	120	130	140
	GCTGTGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTTGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTGCC						

	GCTGTGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGTGAGCGTGCC						
1351	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420
141	150						
	GGGCTGGAGGTCCG 3'						

	GGGCTGGAGGTCCG 3'						
1421	1430						

Figura 10. Análise do resultado do seqüenciamento automático obtida pelo software MacDNASIS de uma linhagem resistente (códon mutado em destaque). A linha de nucleotídeos superior é o produto de PCR de um dos isolados RMP^R que apresenta mutação no códon 531 e a inferior é a seqüência de nucleotídeos de uma linhagem selvagem publicada no GenBank.

5.3.3. Amostras do Rio de Janeiro

Foram avaliados 26 isolados de *M. tuberculosis*, sendo 25 RMP^R. Doze diferentes substituição de aminoácidos foram detectadas, resultantes de 10 diferentes tipos de mutações. Em dezesseis isolados RMP^R foram observadas mutações de ponto nos códons 531 (52%), 516 (8%) e 513 (4%), em um isolado houve deleção de 4 códons (515, 516, 517 e 518) e em outro isolado ocorreu uma mutação de ponto em um códon (513) e a deleção de 3 códons (514, 515, 516). Quatro isolados (16%) de *M. tuberculosis* RMP^R apresentaram mutações de ponto em 2 códons separados resultando na substituição de dois aminoácidos em cada isolado (Ser-513 e Phe-514; Leu-511 e Met-515; Ser-531 e His-526; Leu-511 e Asp-516). No isolado sensível à rifampicina e em um isolado RMP^R não foram observados nenhum tipo de mutação.

5.3.4. Análise geral dos resultados obtidos no seqüenciamento do fragmento de 157 pares de bases

Neste estudo foi analisada uma região de 157 pb no gene *rpoB* em 112 isolados de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina. Foram observadas 22 diferentes mutações, das quais 6 ainda não haviam sido descritos na literatura anteriormente. Mutações de ponto (87,5%) envolvendo sete códons foram as mais freqüentes. Onze amostras (9,8%) exibiram mutações mais complexas, como alterações em duas bases no mesmo códon, deleção de códons e alterações em dois ou mais códons simultaneamente. Nesta região do gene *rpoB* estudada não foram observadas substituições silenciosas, isto é, mutações de ponto que não alteram o aminoácido codificado. As mutações mais freqüentes ocorreram nos códons 531, 526 e 516, com as freqüências de 56,3%, 23,2% e 6,3%, respectivamente (tabela 4).

Os vinte isolados com fenótipo de sensibilidade à rifampicina não apresentaram nenhum tipo de mutação na região de 157 pb seqüenciada. Semelhante observação foi feita em três isolados de *M. tuberculosis* que foram resistentes à rifampicina pelo método das proporções.

5.3.5. Amostras que tiveram uma região maior analisada no gene *rpoB*

Foi observado que três isolados com fenótipo de resistência à rifampicina não apresentaram nenhuma mutação na região de 157 pb seqüenciada. Estes isolados tiveram uma região maior no gene *rpoB* analisada. Em um dos isolados (RS40), o qual provinha do RS, foi observada uma mutação silenciosa no códon 500 (GCC-GCT), evento esse raramente encontrado neste estudo. Um outro isolado, provindo de SP (SP18), não demonstrou nenhum tipo de mutação, mesmo nesta região mais ampla de 600 pb. Em um isolado (RJ30) foram observadas mutações nos códons 486 (ATC-ACC), 583 (CCG-CCA) e 593 (AAG-TAG), sendo a mutação no códon 583 silenciosa.

Tabela 4. Mutações encontradas no gene *rpoB* de *M. tuberculosis* em isolados obtidos de pacientes brasileiros.

Códon alterado no gene <i>rpoB</i> ^a	Mutação específica	Nº (%) de isolados / Origem do Isolado
511	CTG(Leu) → CCG(Pro)	1 (0,9%)/RS
513	CAA(Gln) → CCA(Pro)	1 (0,9%)/RJ
516	GAC(Asp) → GTC(Val) TAC(Tyr)	6 (5,4%)/RS and RJ 1 (0,9%)/RS
522	TCG(Ser) → TTG(Leu)	2 (2,4%)/RS
526	CAC(His) → CTC(Leu) TAC(Tyr) CGC(Arg) TGC(Cys) ^b GAC(Asp) CTG(Leu) ^{b, c}	2 (1,8%)/RS 12 (10,7%)/RS 2 (1,8%)/RS and SP 2 (1,8%)/SP 7 (6,2%)/SP 1 (0,9%)/SP
531	TCG(Ser) → TTG(Leu) TGG(Trp)	RJ 59 (52,7%)/RS, SP, and 4 (3,6%)/RS
533	CTG(Leu) → CCT(Pro) ^{b, c} CCG	1 (0,9%)/SP 1 (0,9%)/SP
531 e 514	TCG(Ser) → TTG(Leu) e TTC(Phe) → GTC(Val) ^b	1 (0,9%)/RJ
531 e 526	TCG(Ser) → TTG(Leu) e CAC(His) → TGC(Cys)	1 (0,9%)/RJ
511 e 516	CTG(Leu) → CGG(Arg) e GAC(Asp) → GTC(Val)	1 (0,9%)/RJ
511 e 515	CTG(Leu) → CCG(Pro) e ATG(Met) → ATA(Ile) ^b	1 (0,9%)/RJ
524, 525, 526 e del 527	TTG(Leu) → TGG (Trp), ACC(Thr) → CCC(Pro), CAC(His) → CAG(Gln), e del AAG(Lys) ^b	1 (0,9%)/RJ
513 e del 514, 515, e 516	CAA(Gln) → CAC(His) and del TTC(Phe), ATG(Met), and GAC(Asp) ^b	1 (0,9%)/RJ
Del 515, 516, 517, e 518	Del ATG(Met), GAC(Asp), CAG(Gln), e AAC(Asn) ^b	1 (0,9%)/RJ

- a) A numeração dos aminoácidos corresponde ao sistema numérico de *E. coli* para a subunidade β da RNA polimerase.
- b) Mutações novas, descritas pela primeira vez neste trabalho.
- c) Dupla mutação no mesmo códon
- d) Não foram incluídos os isolados RMP^R que não apresentaram mutação na região hipervariável de 69 pb (3/112).

5.4. Avaliação dos isolados com INNO-LiPA Rif.TB

Dos 112 isolados de *M. tuberculosis* analisados por seqüenciamento, foram analisados 76 pelo teste comercial INNO-LiPA Rif.TB, onde 14 (18,4%) mostraram resultados discordantes daqueles obtidos no seqüenciamento. Entre os 4 isolados sensíveis, um não foi confirmado pelo teste pois não hibridizou com o oligonucleotídeo S5 e sim com o R5, sugerindo provável contaminação durante a manipulação das amostras. Entre os 72 isolados resistentes à rifampicina 13 mostraram resultados discordantes (17%), sendo que destes suspeita-se que houve contaminação durante a manipulação ou troca em 6 isolados. Cinco isolados com mutação no códon 531 não hibridizaram com o correspondente ao oligonucleotídeo (R5), sendo que três também não hibridizaram com o oligonucleotídeo sensível correspondente (S5). Um isolado com a mutação apenas no códon 516 deveria hibridizar com S5 por não apresentar nenhuma mutação na região deste oligonucleotídeo (abrange os códons 529 a 534), mas o mesmo não ocorreu. Um isolado que apresentou um tipo de mutação mais complexa (Leu524Pro, Thr525Pro, His526Gln e deleção de Lis527), não mostrou um resultado claro, não sendo possível fazer a leitura. Outro isolado com mutação no códon 526 não hibridizou com a sonda sensível correspondente como esperado, mas hibridizou com as duas sondas que abrangem a região afetada (R4 [His526Tyr] e R4a [His526Asp]) apesar de nenhuma apresentar o mesmo tipo de substituição da amostra (His526Leu). A tabela 5 mostra a reatividade das sondas com diferentes isolados. Apesar destes isolados discordantes e descartando as possíveis contaminações, avaliou-se em 91% a eficiência do kit para os isolados brasileiros.

Tabela 5. Exemplos de interpretação dos resultados obtidos com INNO-LiPA Rif.TB. Resultado para cada sonda.

<i>M. tuberculosis</i>	S1	S2	S3	S4	S5	R2	R4a	R4b	R5	Padrão LiPA	Mutação ^b	Interpretação
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Tipo selvagem		Sensível
+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	ΔS1	Em S1	Resistente
+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	ΔS2	Em S2	Resistente
+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	R2	D516V	Resistente
+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	ΔS3	Em S3	Resistente
+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	ΔS4	Em S4	Resistente
+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	R4a	H526Y	Resistente
+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	R4b	H526D	Resistente
+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	ΔS5	Em S5	Resistente
+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	R5	S531L	Resistente

a) A reatividade das sondas com o DNA alvo é designada com um sinal positivo (+) e a ausência de hibridização com um sinal (-). Quando todas as sondas R são negativas e todas as sondas S são positivas, a seqüência tipo selvagem está presente. Se uma das sondas S está faltando e nenhuma R hibridiza, este padrão é descrito com um Δ precedente de uma sonda ausente (por exemplo ΔS1). Se uma sonda S é negativa e a sonda R correspondente é positiva, o padrão é descrito de acordo com a sonda R observado (por exemplo R2).

b) As mutações são descritas como a seguir: primeiro, o resíduo de aminoácido do tipo selvagem e a posição do códon, e finalmente, o resíduo de aminoácido na seqüência mutada.

5.5. RFLP

Dentre os isolados que tiveram parte do gene *rpoB* seqüenciados, 55 foram analisados por RFLP. Entre esses, 50 eram resistentes à rifampicina e 5 eram sensíveis. Estas análises revelaram que 38 (67%) dos isolados de *M. tuberculosis* mostraram padrão único de RFLP e que 18 (33%) apresentaram padrões agrupáveis. Estes isolados apresentaram de 4 a 25 cópias do IS6110, onde a grande maioria (70%) apresentou de 9 a 13 cópias. Apenas 1 (2%) apresentou menos que 5 cópias do elemento de inserção. Foram obtidos 5 diferentes *clusters* dos padrões de RFLP.

As análises por RFLP mostraram que isolados com o mesmo alelo do gene *rpoB* podem ter diferentes padrões de RFLP e isolados com mesmo padrão de RFLP podem apresentar distintos alelos do gene *rpoB*.

Entretanto, também foram identificados alguns isolados que tinham o mesmo padrão de RFLP e o mesmo tipo de mutação no gene *rpoB*. Três isolados do estado de São Paulo apresentaram o padrão de RFLP, designado tipo Q, e mostraram a mesma mutação no códon 531 (todas providas do Instituto Adolfo Lutz). Outros três isolados do Rio Grande do Sul e um de São Paulo mostraram o mesmo padrão de RFLP, que foi chamado tipo A, e todos tiveram mutação no códon 531. Entretanto, em dois isolados do Rio Grande do Sul foi observado um tipo de mutação pouco freqüente (TCG-531-TGG). O padrão de RFLP designado tipo D foi observado em 5 isolados obtidos no RS, sendo que 4 desses isolados tinham mutação no códon 531. A figura 11 mostra a representação esquemática da bandas obtidas e agrupadas pela mutação no códon 531.

Entre os isolados com mutação no códon 526, foram observados três isolados do RS que mostraram o mesmo padrão de RFLP, designado tipo D1 (figura 12). Outro isolado também mostrou o padrão D1, mas a mutação relacionada com a resistência à rifampicina ocorreu no códon 522 do gene *rpoB*. Os padrões de RFLP D (9 bandas) e D1 (8 bandas) foram considerados relacionados clonalmente, pois houve o compartilhamento de 8 bandas. A figura 13- mostra alguns isolados obtidos no RS e SP em que houve formação de *cluster*.

As linhagens dos estados RS e SP parecem ser geneticamente mais próximas que as linhagens do RJ. Deste último estado foram analisados 19 isolados que foram distribuídos em 19 diferentes padrões de RFLP. Quando analisamos os isolados por estado observamos que nos estados de RS e SP é possível fazer uma associação entre os padrões de RFLP, diferente do que ocorre com os isolados do RJ, como pode ser visualizado na figura 14.

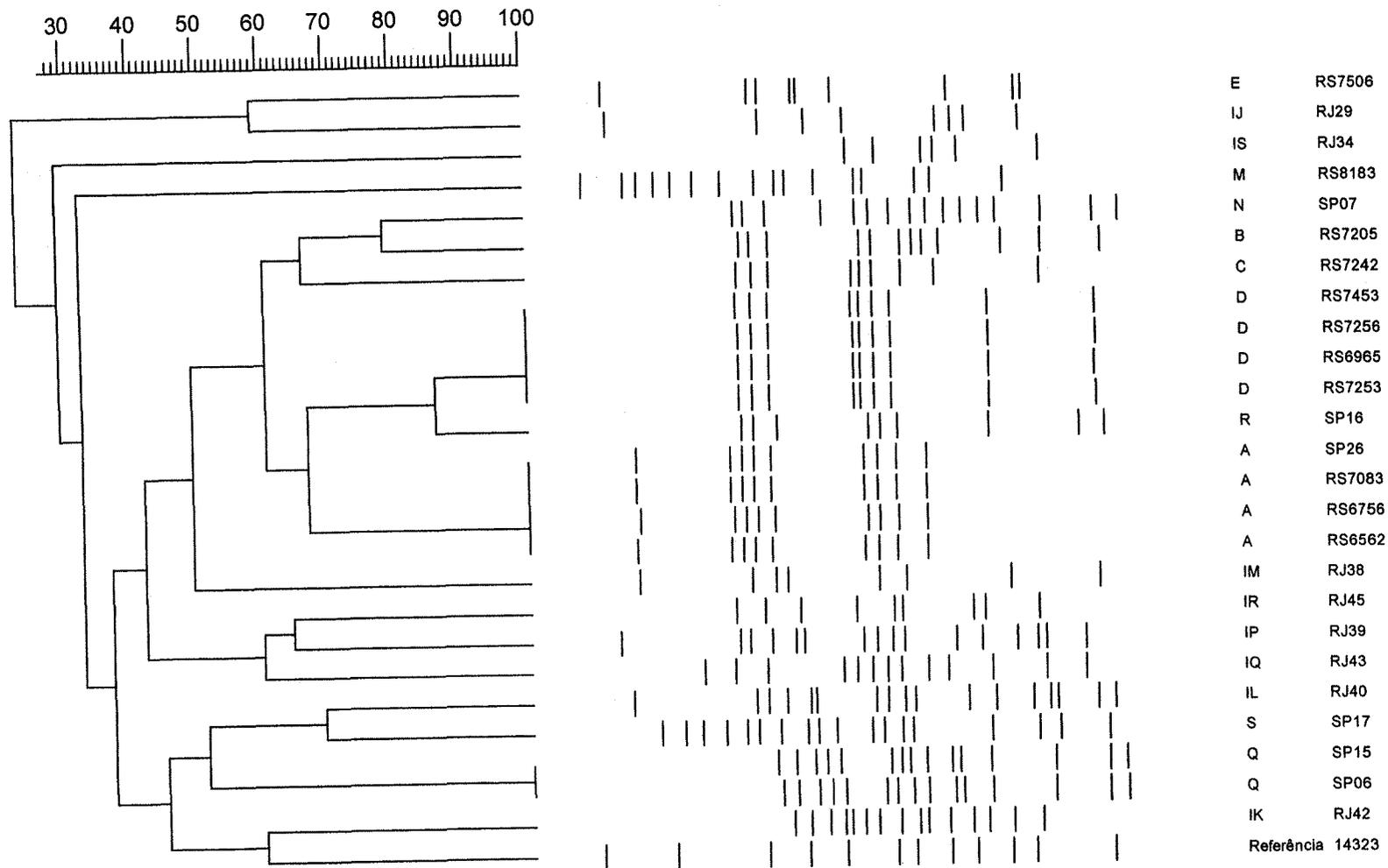


Figura 11. Representação esquemática dos padrões de RFLP e dendrograma obtidos de isolados de *M. tuberculosis* que apresentaram mutação no códon 531 do gene *rpoB*. As posições das bandas do IS6110 foram normalizadas e são mostradas como linhas. A escala retrata a similaridade dos padrões, calculada como descrito no materiais e métodos.

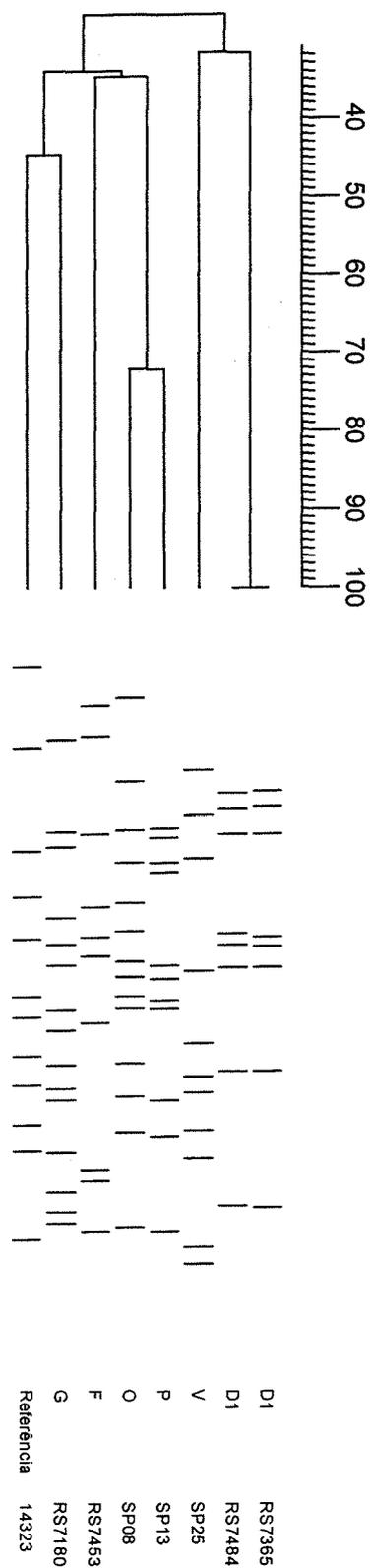


Figura 12. Dendogramas dos *Southern blots* produzidos com o software GelCompar mostrando os padrões de RFLP e o percentual de similaridades entre os isolados que apresentaram mutação no códon 526 no gene *rpoB*.

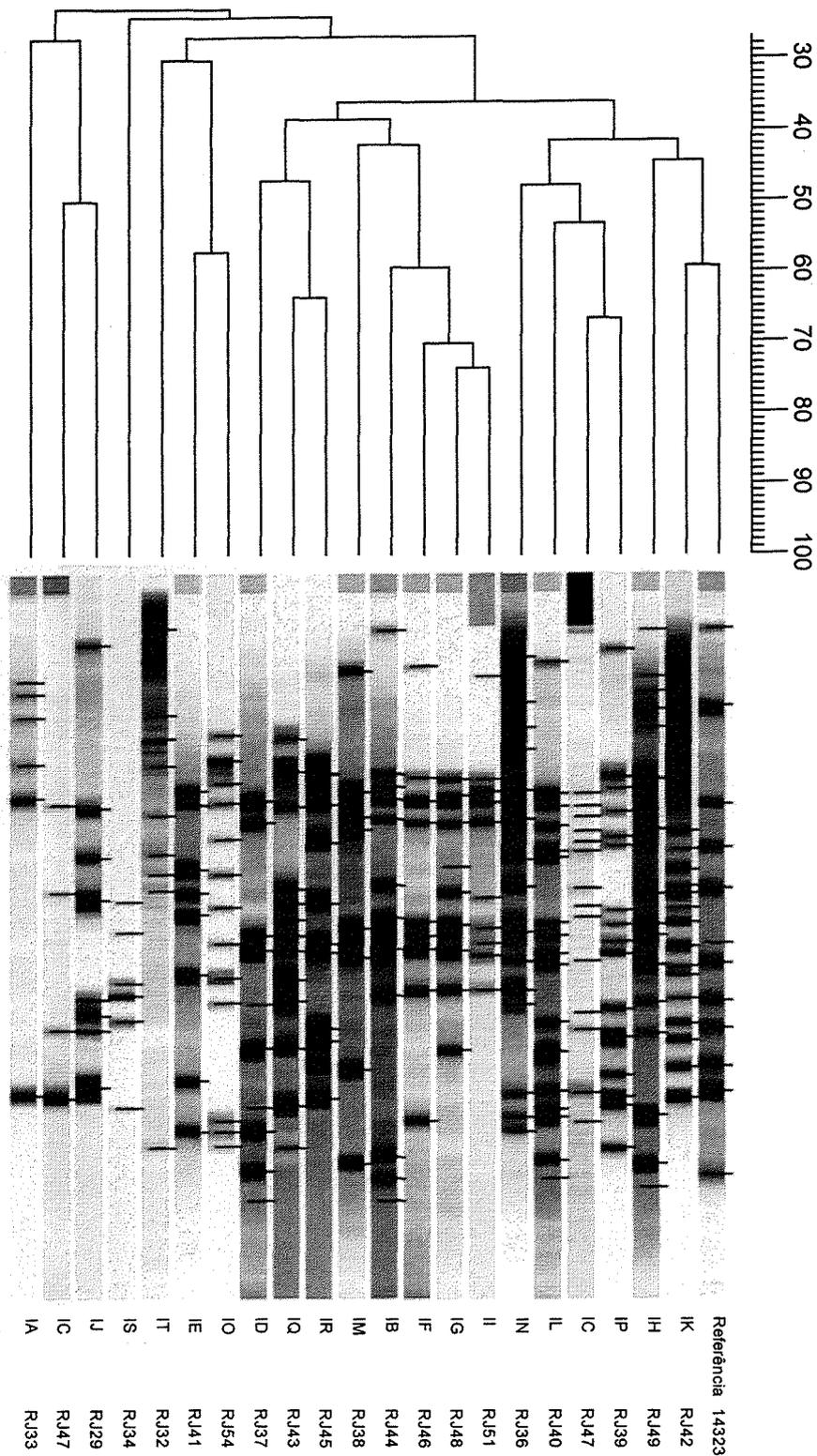


Figura 14. Dendogramas do *Southern blots* produzidos com o software GelCompar mostrando os padrões de RFLP e o percentual de similaridades entre os isolados do Rio de Janeiro.

6. Discussão

6.1. Caracterização das mutações

A resistência à rifampicina é observada com menor frequência do que a resistência à isoniazida e estreptomicina (WHO, 1997), entretanto, a resistência à rifampicina é geralmente associada com a resistência à isoniazida. Em geral, a resistência a esses dois fármacos é adquirida em duas etapas, onde a primeira etapa é o desenvolvimento da resistência à isoniazida seguida pelo desenvolvimento da resistência à rifampicina. Isso sugere que a rifampicina possa ser usada como marcador substituto para a detecção das linhagens MDR (Telenti *et al.*, 1993b). Nesse estudo a maior parte das linhagens resistentes à rifampicina foram resistentes também à isoniazida.

A resistência a um ou mais fármacos apresentada pelo *M. tuberculosis* está aumentando e tem sido observado um aumento no número de casos de TB resistentes a vários fármacos (WHO, 1997). Este fato enfatiza a necessidade do desenvolvimento de métodos mais rápidos e eficazes para a detecção do *M. tuberculosis* e a determinação da sensibilidade aos fármacos, otimizando o tratamento e levando a um maior controle da doença.

Este trabalho representa um dos primeiros a avaliar as mutações no gene *rpoB* em isolados de *M. tuberculosis* obtidos de pacientes brasileiros. Neste estudo foram descritas várias mutações características no gene *rpoB* do *M. tuberculosis* isolados no Brasil, expandindo a área geográfica estudada até o momento (Ohno *et al.*, 1996; Cooksey *et al.*, 1997; Matsiota-Bernard *et al.*, 1998; Yuen *et al.*, 1999).

A presença de mutações em uma região restrita do gene *rpoB* é encontrada em mais de 96% das linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a vários níveis de rifampicina (Felmeé *et al.*, 1995; Telenti *et al.*, 1993b; Willians *et al.*, 1994; Kapur *et al.*, 1994). Apesar de mais de 30 distintas mutações terem sido descritas dentro de uma região hipervariável de 69 pb no gene *rpoB* como responsáveis pela mudança para o fenótipo resistente, apenas duas delas (Ser531Leu e His526Tyr) são responsáveis por mais de 65% das alterações que levam à resistência à rifampicina (Kapur *et al.*, 1994; Telenti *et al.*, 1993b; Telenti *et al.*, 1997). Nesse estudo observamos que 63% das amostras

analisadas apresentaram esse tipo de mutação. Essas substituições são consideradas importantes para a aquisição do fenótipo de resistência à rifampicina, e está bem evidenciado que esses dois aminoácidos são sítios críticos para essa característica.

Jin & Gross (1988) classificaram o gene *rpoB* em *clusters* nos quais podem ocorrer as mutações relacionadas com a resistência à rifampicina: *cluster* I, que codifica os aminoácidos 507 a 533, *cluster* II localizado nos aminoácidos 563, 564 e 572 e *cluster* III contendo o códon para Arg⁶⁸⁷. Conforme já discutido a grande maioria das mutações ocorre no *cluster* I ou na região determinante da resistência à rifampicina.

Nesse estudo observou-se que 85,8% dos isolados de *M. tuberculosis* com o fenótipo RMP^R contêm mutações *missense* que levam a substituição dos aminoácidos Ser₅₃₁ (56,3%), His₅₂₆ (23,2%) e Asp₅₁₆ (6,3%). Resultados similares nos códons mutados e na frequência dos códons substituídos foram descritos previamente (Kapur *et al.*, 1994; Matsiota-Bernard *et al.*, 1998; Telenti *et al.*, 1993b; Telenti *et al.*, 1997; Scarpellini *et al.*, 1997). Outras mutações *missense* assim como deleções foram encontradas em 14,2% dos isolados de *M. tuberculosis* RMP^R. Outro achado característico deste estudo foi a alta frequência de mutações ocorrendo em dois códons separados no isolados obtidos no RJ (16%).

Nos isolados do RJ foi observado ainda a combinação de mutações de ponto com deleção de um ou mais códons em duas linhagens (Gln₅₁₃His, deleção da Lys₅₁₄, Tyr₅₁₅ e Leu₅₁₆ em um isolado, Leu₅₂₄Trp, Tyr₅₂₅Pro, His₅₂₆Gln e deleção de Phe₅₂₇ em outro) e um isolado apresentou deleção de 4 códons (Tyr₅₁₅, Leu₅₁₆, Val₅₁₇ e Leu₅₁₈).

Os isolados provindos do RS e SP mostraram uma certa similaridade na frequência das mutações. A maioria das mutações de ponto ocorreu nos códons 531 e 526, sendo que as mutações que ocorreram no códon 531 correspondem, na maioria das vezes, a um único alelo (TCG→TTG). No códon 526 foram observados 8 diferentes alelos em 16 isolados de ambos os estados, porém nenhum dos isolados obtidos no RJ apresentaram mutação somente neste códon. As amostras do RJ mostraram uma ampla variedade de alelos, incluindo aqueles que apresentaram dois códons mutados simultaneamente (4 casos), as deleções associadas com mutações de ponto no mesmo isolado (2 casos) e a deleção de 12 nucleotídeos em um isolado.

Não foram identificadas mutações na região de 157 pb em três isolados com o fenótipo de resistência à rifampicina. Observações semelhantes foram descritas por outros (Kapur *et al.*, 1994; Matsiota-Bernard *et al.*, 1998; Telenti *et al.*, 1993b).

Quando uma região maior do gene *rpoB* dos isolados RMP^R em que não foram encontradas mutações foi seqüenciada observou-se que um deles (PR18) não apresentou nenhuma mutação, outro (RS40) apresentou uma substituição silenciosa e outro (RJ30) continha mutação de ponto nos códons 468 (ATC→ACC), 583 (CCG→CCA) e 593 (AAG→TAG). A mutação no códon 583 não levou a troca de aminoácido, levando a crer que as outras duas mutações possam ser responsáveis pelo fenótipo RMP^R neste isolado.

A ausência de mutação na RDRR de alguns isolados RMP^R pode ser explicada pela possibilidade que outras regiões do gene possam conferir resistência ou que possam ocorrer mutações em outras subunidades da RNAP que levem a alterações da conformação da região de ligação da rifampicina na subunidade β. Não se pode excluir que outros mecanismos de resistência possam estar presentes como a diminuição da entrada do antibiótico para dentro da bactéria, efluxo, degradação enzimática ou modificação da rifampicina (Kapur *et al.*, 1994; Hetherington *et al.*, 1995).

Os mecanismos relacionados com a resistência à rifampicina descritos para outros organismos são em muitos casos também associados com o gene *rpoB*. Em *M. leprae* têm sido descritas principalmente no códon 425 (Honore & Cole, 1993). As mutações no gene *rpoB* em *Neisseria meningitidis* são também relacionadas com a resistência à rifampicina, bem como alterações na permeabilidade da membrana (Abadi, 1996). Mutações de ponto em *Rickettsia prowazekii* (Arg526Lys) e em *Rickettsia typhi* (nos aminoácidos 151, 201 e 271) foram também reportadas neste gene (Rachek *et al.*, 1998; Troyer *et al.*, 1998).

Porém, Hetherington *et al.* (1995) não encontraram em *M. smegmatis* nenhuma diferença nos *clusters* I, II e III entre os isolados sensíveis e resistentes à rifampicina. Por outro lado, que em *Rhodococcus equi* foi identificado um gene designado *iri* capaz de inativar o antibiótico via decomposição do mesmo (Andersen *et al.*, 1997). Em *Pseudomonas fluorescens* a resistência à RMP é mediada por plasmídeo (Chandrasekaran & Lalithakumari, 1998).

Nos isolados de *M. tuberculosis* sensíveis à rifampicina não foram observadas mutações *missense* assim como nenhum tipo de mutação silenciosa no gene *rpoB*. Apenas em dois isolados RMP^R foram observadas mutações silenciosas.

A presença de mutações em uma região restrita no gene *rpoB* é descrita em mais de 96% das linhagens de *M. tuberculosis* relacionadas com vários níveis de resistência à rifampicina (Kapur *et al.*, 1994; Felmeé *et al.*, 1995). Os níveis de resistência, determinado pela medida da concentração mínima inibitória, parecem estar relacionados com o tipo de mutação. Ohno *et al.* (1997) estudaram essa relação e mostraram em 43 isolados de *M. tuberculosis* que a substituição de Leu por Trp no códon 531 resulta em um alto nível de resistência. As substituições nos códons 526 e 516 levam a vários de níveis de resistência à rifampicina, dependendo do aminoácido substituído.

Não foi encontrada nenhuma associação entre uma mutação em particular e o padrão de sensibilidade aos fármacos nos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina, concordando com a visão de que as mutações que levam à resistência à rifampicina são eventos independentes às mutações que levam à resistência a outros fármacos (Willians *et al.*, 1994).

Conforme já comentado as mutações espontâneas que levam à resistência à rifampicina no *M. tuberculosis* ocorrem raramente (CDC, 1993, Riley, 1993) e os regimes terapêuticos com múltiplos fármacos podem prevenir o surgimento da resistência clínica. O problema da resistência resulta de tratamento inadequado, freqüentemente devido ao regime inapropriado como o abandono, o não cumprimento da duração do tratamento, o uso irregular dos fármacos, o uso incorreto das doses por erro de prescrição como não ser levada em conta a interação medicamentosa, ou por decisão espontânea do paciente (Hirano *et al.*, 1999). A resistência a múltiplos fármacos parece ser o resultado de aquisições seqüenciais de novas mutações nos diferentes genes relacionados com o alvo dos fármacos (Heym *et al.*, 1994).

Os pacientes infectados com linhagens resistentes a múltiplos fármacos tem menor probabilidade de serem curados, e seus tratamentos são mais tóxicos e mais caros que os dos pacientes infectados com organismos sensíveis.

Segundo o Ministério da Saúde, o tratamento e o diagnóstico da tuberculose é barato, custando 420 reais por caso, se o paciente for tratado com rigor durante 6 meses e tiver sido infectado por linhagem sensível. Mas, cerca de 15% dos pacientes

abandonam o tratamento e posteriormente o novo tratamento dura de 18 a 24 meses chegando a custar 4.000 reais.

No Brasil, de acordo com relatório da OMS, os níveis de resistência adquirida à rifampicina são em torno de 6% dos casos de TB notificados. A resistência adquirida pode explicar o surgimento de novos tipos de mutações, uma vez que nos casos de resistência primária o paciente é infectado com uma linhagem resistente, isto é, que já apresenta mutação no gene *rpoB*. Quando o paciente é infectado com uma linhagem sensível de *M. tuberculosis* e inicia o tratamento, mas por alguma razão não o segue, existe uma alta probabilidade de seleção de linhagem resistente. Essa resistência pode ser o resultado de qualquer tipo de mutação no gene *rpoB*, incluindo as mutações mais frequentes ou um novo tipo de mutação.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que as diferenças encontradas nos isolados do RJ quando comparados com os isolados de SP e RS, como ausência de mutação apenas no códon 526 e deleção de um ou mais códons são devido a diferenças no tratamento e a taxa de abandono do tratamento entre os diferentes estados.

No Brasil, um dos principais problemas para o controle da TB atualmente tem sido o abandono do tratamento, que alcança uma taxa de 14% (WHO, 1999). No Rio de Janeiro essa taxa é de 30%, em São Paulo é de 20% (Fortes & Dalcomo, 1997) e no Rio Grande do Sul foi estimado no ano de 1998 em 15,2% de todos os casos notificados (Secretária da Saúde do RS). Isso tem contribuído decisivamente para o aumento do número de casos de doentes portadores de bacilos resistentes aos principais fármacos disponíveis para o tratamento da TB.

A implementação do DOTS, como sugerido pela OMS, se faz necessária urgentemente para evitar o desenvolvimento de novas linhagens resistentes e diminuir a transmissão das linhagens MDR, auxiliando no controle da TB mais eficientemente.

6.2. Avaliação do teste comercial

Em torno de 30 diferentes tipos de mutações dentro de uma região *hipervariável* de 69 pb no gene *rpoB* relacionadas com a resistência à rifampicina foram descritas (Musser, 1995), sendo que duas destas mutações (Ser531Leu e His526Tyr) são responsáveis por mais de 65% do total de mutações. O kit LiPA inclui sondas para essas mutações bem como para duas mutações adicionais (His526Asp e Asp516Val). Os

resultados de seqüenciamento para essas mutações neste trabalho concordam em 75% (84 isolados apresentaram essas mutações).

A aplicação do INNO-LiPA para o reconhecimento do genótipo de resistência à RMP mostrou-se de grande valor. Os padrões que diferiram do padrão da linhagem selvagem foram considerados como provindos de linhagens resistentes, enquanto, algumas mutações responsáveis pelo fenótipo de resistência puderam ser definidas pela hibridização com o oligonucleotídeo correspondente. A frequência de mutações caracterizadas pelo perfil ΔS é explicado pelo desaparecimento da banda sensível sem o aparecimento da banda resistente correspondente. Esse perfil permite localizar a região em que ocorreu a mutação sem identificar a posição exata e nem o tipo de mutação.

Em conclusão, os resultados obtidos com o teste INNO-LiPA Rif.TB nem sempre concordam com aqueles obtidos pelo seqüenciamento com relação ao exato mecanismo da resistência à rifampicina, mas são muito próximos dos resultados fenotípicos e podem auxiliar fornecendo um rápido diagnóstico de isolados de *M. tuberculosis* com relação a resistência à rifampicina. O teste demonstra ser de fácil execução, relativamente rápido, e abrange uma grande percentagem de mutações encontradas nos isolados obtidos em diferentes estados brasileiros. Seu maior problema é sem dúvida o alto custo, o que o torna inviável na rotina laboratorial dos centros de Saúde Pública. Algumas mutações como deleções, inserções e mutações fora da região abrangida pelo teste podem não ser detectadas fornecendo um resultado falso negativo.

6.3. RFLP

O Brasil está entre os 13 países identificados pela OMS que possuem 75% de todos os casos de TB do mundo (WHO, 1997). Só em São Paulo são reportados mais de 5000 casos de TB a cada ano (Ferrazoli *et al.*, 2000). Os novos casos de TB podem ocorrer devido a uma infecção exógena recente ou devido à reativação da infecção latente endógena. Os critérios clínicos para fazer a distinção são relativamente insensíveis e os pacientes infectados pelo HIV apresentam um risco elevado para ambos os tipos de infecção. Os estudos, usando RFLP e o IS6110, baseados em populações dos centros urbanos permite uma classificação mais confiável dos novos casos de TB. Especificamente, isolados de *M. tuberculosis* que apresentam padrões agrupáveis são considerados como originados de infecção adquirida recentemente e isolados com padrões únicos de RFLP, não agrupáveis, são considerados representantes de reativação

da infecção adquirida em um passado remoto (Small & Van Embden, 1994; Ferreira *et al.*, 1996; van Soolingen *et al.*, 1993).

O grau de polimorfismo na população de *M. tuberculosis* pode servir como um indicador da relativa contribuição da infecção adquirida recentemente ou da reativação. Se é considerada uma infecção recentemente adquirida como resultado de uma transmissão em curso haverá um limitado polimorfismo na população. Entretanto, se a doença resulta de reativação de uma infecção latente, haverá considerável diversidade, refletindo a diversidade de tempos e lugares em que os pacientes foram infectados (Small & van Embden, 1994).

Esse conceito foi validado em San Francisco (EUA), onde a prevalência de agrupamento das linhagens é maior em pacientes que apresentam epidemiologicamente um alto risco de contrair TB como consequência de uma infecção recente e baixo naqueles que são prováveis de contrair TB como um resultado de reativação de infecção latente (como imigrantes idosos vindos de países com alta prevalência de TB) (Small *et al.*, 1994). A tipificação por DNA de linhagens selecionadas na comunidade pode identificar quais populações desenvolvem TB como consequência de reativação de infecção latente (Small & van Embden, 1994).

Quando aplicamos esta ferramenta epidemiológica molecular em 55 isolados de pacientes provindos de distintos estados do Brasil, e diagnosticados com TB ativa, encontramos que 18 (33%) estavam infectados com *M. tuberculosis* representando transmissão recente. A frequência do padrão de linhagens agrupadas, em países onde a taxa de TB endêmica é relativamente baixa, uma fração substancial dos novos casos clínicos representam infecção recentemente adquirida. Na cidade de Nova York, a qual apresenta a maior incidência de TB na América do Norte, a proporção de novos casos de TB que desenvolvem infecções recentes foi estimado em 38-41% (Friedman *et al.*, 1995), em San Francisco foi 40% (Small *et al.*, 1994) e em Amsterdã foi 47% (van Deutekom *et al.*, 1997).

Devido ao grande número da incidência de casos nos países onde a TB é endêmica é difícil realizar estudos populacionais comparativos, mas Ferrazoli *et al.* (2000) obtiveram dados da cidade de São Paulo, onde foram estudados 293 pacientes com TB ativa. Destes, mostrou-se que 94 (32%) estavam infectados com isolados de *M. tuberculosis* representando infecção recente. E mostrou-se também que a frequência dos

padrões agrupáveis foi significativamente maior nos 151 pacientes HIV positivos que nos 142 pacientes HIV negativos (38% x 25%, respectivamente) (Ferrazoli *et al.*, 2000).

No presente estudo foi observado que os isolados do Rio de Janeiro apresentaram uma grande variabilidade clonal, isto é, não foi possível detectar a formação de *cluster*. Enquanto, no RS e SP foi possível observar que alguns isolados estavam relacionados epidemiologicamente. Uma possível explicação para esse fato é a incidência da TB. O RJ tem uma alta incidência por habitante (126,8/100.000), que é superior a incidência do RS e SP. Essa diferença na incidência sugere a existência de um número maior de linhagens circulantes por haver um maior número de casos de TB, e, como o número de isolados analisados pela técnica de RFLP foi pequeno não é possível fazer nenhuma correlação epidemiológica.

A relação entre infecção recente e TB MDR foi analisada na cidade de Nova York e foi observado que 80% dos novos isolados MDR são resultantes de novas infecções (Friedman *et al.*, 1995), e que a uma grande proporção adquire a doença nas instituições de saúde, particularmente os pacientes HIV positivos.

Neste estudo foram observados dois *clusters*, D e D1, que diferiam em apenas uma banda no padrão de RFLP. Segundo alguns autores esses *clusters* podem ser classificados como geneticamente relacionados por diferirem em apenas uma banda (Small *et al.*, 1994; Tenover *et al.*, 1997)

A associação entre as mutações RMP^R e os padrões obtidos por RFLP, nos isolados testados, revelou que as mutações afetando os códons Ser531, His526 e Arg516 foram encontradas em isolados com diferentes padrões de RFLP. Os isolados de *M. tuberculosis* MDR que exibiam o mesmo padrão de RFLP continham diferentes mutações no gene *rpoB*, e a maioria dos isolados com a mesma mutação exibiam diferentes padrões de RFLP. Mas em alguns casos, foi possível correlacionar as mutações no gene *rpoB* com o padrão de RFLP, indicando infecção recentemente adquirida.

Assim, a tipificação molecular das linhagens fornece informação epidemiológica adicional facilitando o reconhecimento dos surtos ou surtos aparentes e subsequente refinamento das estratégias de intervenção. E ainda, esse tipo de estudo tem identificado grupos de risco para infecção recente, aos quais podem ser direcionadas estratégias em segmentos específicos da comunidade onde a transmissão da TB não é bem controlada.

7. Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que os tipos de mutações encontradas nos isolados brasileiros apresentam uma distribuição muito semelhante ao encontrado em outros estudos, que utilizam isolados de *M. tuberculosis* de diversas partes do mundo. Os isolados obtidos no Brasil apresentaram seis mutações ainda não descritas na literatura.

A partir do RFLP foi possível observar que a maioria dos isolados MDR não apresentavam relação epidemiológica. Apesar do número de isolados analisados pela técnica não ser o ideal, foi possível observar que as linhagens resistentes à RMP não pertencem a um único clone e que apenas em alguns casos foi possível observar uma relação clonal.

O sucesso do emprego de fármacos antimicrobianos no controle de doenças infecto-contagiosas deu prestígio a atual medicina, e é o grande responsável pela complacência da sociedade como um todo com o problema da resistência. A atenção principal com o problema da resistência aos fármacos tem sido dirigida, em escala mundial, e sobretudo nos países desenvolvidos, para infecções hospitalares devido ao fato dos hospitais serem o nicho ecológico onde os microrganismos estão sob constante pressão seletiva dos fármacos antimicrobianos. Nos países em desenvolvimento, onde não existe a necessidade de prescrição médica para a compra de antimicrobianos, a comunidade é também um nicho ecológico importante para a emergência, persistência e disseminação da resistência.

Os episódios de óbitos causados por microrganismos resistentes a múltiplos fármacos são assustadores em escala mundial. As publicações especializadas mais recentes sugerem que, se o problema continuar de maneira acelerada como atualmente, chegaremos dentro em pouco à repetição de epidemias como as que ocorriam na época pré-antibiótica.

A resistência representa um perigo sobre o qual nem todos estão cientes, baseados na confiança da capacidade de resposta da indústria farmacêutica em sintetizar ou modificar fármacos para o uso imediato. No entanto, números alarmantes de resistência aos antimicrobianos estão sendo notificados. Com a advento da AIDS, o *M.*

tuberculosis emergiu como um matador, equipado com genes de resistência múltipla aos agentes antituberculose.

A possibilidade de reconhecimento de linhagens resistentes em uma fase inicial do tratamento pode auxiliar na busca de novos esquemas terapêuticos, na tentativa de diminuir as populações bacterianas resistentes. As novas metodologias utilizando biologia molecular estão mostrando muitas perspectivas para o reconhecimento rápido de linhagens resistentes. As principais vantagens são rapidez e especificidade com que se pode realizá-las. Em algumas das técnicas é necessário apenas purificar o DNA do *M. tuberculosis* e fazer a reação, que pode levar menos de 48 horas.

No entanto, cabe considerar que apesar de altamente eficiente, as novas técnicas ainda estão sendo testadas em laboratórios de diagnóstico, e necessitam de muitas pesquisas para ter uma segurança comparável com as técnicas tradicionais.

Ao concluir-se esse trabalho considera-se fundamental, para o controle da TB, a implantação do DOTS. Mas sabe-se que para implantação deste sistema são necessárias mudanças drásticas na política de saúde pública. Ao implantar-se o DOTS é necessário que o governo tenha compromisso com o PNCT.

As pesquisas devem continuar por serem necessárias para alcançar o sucesso no controle da TB. Almeja-se que ocorram progressos no desenvolvimento de estratégias para novos tratamentos a curto prazo e, em muitos assuntos que são endereçados para alcançar o sucesso na avaliação e desenho de estratégias de controle mais efetivas.

8. Referências bibliográficas

- Abadi, F. J. R., P. Carter, P. Cash, T. H. Pennington.** 1996. Rifampin Resistance in *Neisseria meningitidis* due to alterations in membrane permeability. **Antimicrob. Agents Chemother.** 40:646-651.
- Alito, A., N. Morcillo, S. Scipioni, A. Dolmann, M. I. Romano, A. Cataldi, D. van Soolingen.** 1999. The IS6110 restriction fragment length polymorphism in particular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for realible use in outbreak investigation. **J. Clin. Microbiol.** 37:788-791.
- Allen, P. N. & H. F. Noller.** 1989. Mutations in ribossomal proteins S4 and S12 influence the higher order structure of 16 S ribossomal RNA. **J. Mol. Biol.** 208:457-468.
- Andersen, S. J., S. Quan, B. Gowan, E. R. Dabbs.** 1997. Monooxygenase-like sequence of a *Rhodococcus equi* gene conferring increased resistance to rifampin by inactivating this antibiotic. **Antimicrob. Agents Chemother.** 41:218-221.
- Banerjee, A.; E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K. S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. Lisle, W. R. Jacobs Jr.** 1994. *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science.** 263:227-230.
- Bifani, P. J., B. B. Plikaytis, V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, M. L. Lutfey, S. L. Moghazeh, W. Eisner, T. M. Daniel, M. H. Kaplan, J. T. Crawford, J. M. Musser, B. N. Kreiswirth.** 1996. Origin and interstate spread of New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. **JAMA** 275:452-457.
- Blanchard, J. S.** 1996. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Annu. Rev. Biochem.,** 65:215-239.
- Blomm, B. R. (Ed.).** Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington: ASM Press, 1994.
- Bodmer, T., G. Zürcher, P. Imboden, A. Telenti.** 1995. Mutation position and type of substitution in the β -subunit of the RNA polymerase influence in-vitro of

-
- rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Antimicrob Chemother.** 35:345-348.
- Bradford, W. Z., J. N. Martin, A. L. Reingold, G. F. Schecter, P. C. Hopewell, P. M. Small.** 1996. The changing epidemiology of acquired drug-resistant tuberculosis in San Francisco, USA. **Lancet.** 348:928-931.
- Brasil.** 1995. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Pneumologia Sanitária. **Manual de normas para o controle da tuberculose.** 4. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde.
- Brasil.** 1997. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Boletim Epidemiol 2:6.
- Brasil.** 1999. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Boletim Epidemiol.7:1
- Brennan, P. J. & P. Draper.** 1994. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom, B. R. (Ed.). **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.** Washington: ASM Press.
- Burdney, K., J. Dobkin.** 1991. Resurgent tuberculosis in New York City: human immunodeficiency virus, homeless, and the decline of tuberculosis control programs. **Am. Rev. Respir. Dis.** 144:745-749.
- Canetti, G.** 1965. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. **Am. Ver. Respir. Dis.** 92:687-703.
- Canetti, G. W. Fox, A. Khomenko, H. T. Mahler, N. K. Menon, D. A. Mitchison, N. Rist, and N. A. Smeley.** 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. **Bull. W. H. O.** 41:21-43.
- Caugant, D. A., P. Sandven, J. Eng, J. T. Jeque, T. Tonjum.** 1995. Detection of rifampin resistance among isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mozambique. **Microbiol. Drug Resist.** 4:321-326.
- Centers For Disease Control And Prevention. Recomendations Of The Advisory Council For The Elimination Of Tuberculosis.** 1993. Inicial therapy for

-
- tuberculosis in the era of multidrug resistance. **Morbid. Mortal. Weekly Rep.**, 42:1-8.
- Centers For Disease Control And Prevention.** 1996. Clinical update: impact of HIV protease inhibitors on the treatment of HIV-infected tuberculosis patients with rifampin. **Morb Mortal Wkly Rep.** 45:921-925.
- Chambers, H. F. & G. F. Schecter.** 1997. *Mycobacterium tuberculosis* infection. <http://www.hivinsite.ucsf.edu/akb/1997/06TB/index.html>.
- Chandrasekaran, S. & D. Lalithakumari.** 1998. Plasmid-mediated rifampicin resistance in *Pseudomonas fluorescens*. **J. Med. Microbiol.** 47:197-200.
- Chertov, O. Y., A. N. Obuknov, V. M. Lipkin.** 1983. RNA polymerase-rifamycin: A molecular model of inhibition. **Soviet J. of Bioorganic chemistry**, 9: 326-332.
- Chopra, I. & P. Brennan.** 1998. Molecular action of antimycobacterial agents. **Tuberc Lung Dis.** 78:89-98.
- Cole, S. T.** *Mycobacterium tuberculosis*: drug-resistance mechanisms. **Trends in Microbiol.** 2:411-415, 1994.
- Cole, T. S., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, C. E. Barry III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead & B. G. Barrell.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature.** 393:-544.
- Cooksey, R. C., G. P. Morlock, S. Glickmans, and J. T. Crawford.** 1997. Evaluation of line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York city. **J. Clin. Microbiol.** 35:1281-1283.

- Danilova, I.; Stoyunin, M.; Repina, E.; Vorobiov, M.; Adreevna, O.; Khomenko, A.; Puzanov, V.; Kapkov, L.; Punga, V.; Oswald, G.; Afanasiev, N.; Carrino, C.; Migliori, G. B.; Ambrosetti, M.; Maugeri, F. S.; Grzemska, M.; Espinal, M.; Raviglione, M.; Goldfarb, A.** Primary Multidrug-Resistant Tuberculosis – Ivanovo Oblast, Russia, 1999. *MMWR*, vol 48,n 30.
- De Benhouwer, H. Z. Lhiang, G. Jannes, W. Mijis, L. Machtelinckx, H. Rossau.** 1995. Rapid Detection of Rifampin Resistance in Sputum and Biopsy Samples from Tuberculosis Patients by PCR and Line Probe Assay. *Tubercle and Lung Diseases* 76:425-430.
- D’Esopo, N. D.** 1982. Clinical trials in pulmonary tuberculosis. *Am. Ver. Respir. Dis.* 125(supl):85-93.
- Dickinson, J. M. & D. A. Mitchison.** Experimental models to explain the high sterilizing activity of rifampin in chemotherapy of tuberculosis. *Ann. Rev. Respir. Dis.*, 123:367-371, 1981.
- Drobniewski, F. A. and S. M. Wilson.** 1998 .The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance resistance in *Mycobacterium tuberculosis* – a molecular story. *J. Med. Microbiol.* 47:189-196.
- Escalante, P., S. Ramaswamy, H. Sanabria.** 1998. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuber. Lung. Dis.* 79:111-118.
- Fang, Z., C. Doig, A. Rayner, D. T. Kenna, B. Watt, J. Forbes.** 1999. Molecular evidence for heterogeneity of multiple-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* population in Scotland (1990 to 1997). *J. Clin. Microbiol.* 37:998-1003.
- Felmlee, T. A., Q. Liu, A. C. Whelen, D. Williams, S. S. Sommer, and D. H. Persing.** 1995. Genotypic Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Rifampin Resistance: Comparison of Single-Strand Conformation Polymorphism and Dideoxy Fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 33:1617-1623.
- Ferrazoli, L., M. Palaci, L. R. M. Marques, L. F. Jamal, J. B. Afiune, E. Chimara, M. C. Martins, M. A. S. Telles, C. A. F. Oliveira, M. C. Palhares, D. T. A. Spada, L. Riley.** 2000. Transmission of Tuberculosis in an Endemic Urban Setting in Brazil. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4:1-8.

- Ferreira, M., L. Ferrazoli, M. Palaci.** 1996. Tuberculosis and HIV infection among female inmates in São Paulo, Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** 13:177-183.
- Finken, M.; P. Kirshner, A. Meier, A. Wrede, E. Bottger.** 1993. Molecular basis de streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a funcional 16S ribosomal RNA pseudoknot. **Mol. Microbiol.** 9:1239-1246.
- Fortes, A., M. P. Dalcomo.** 1997. Tuberculose multirresistente. **Pulmão.** 6 (2): 68-80.
- Friedman, C. R., M. Y. Stoeckle, B. N. Kreiswirth.** 1995. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a large urban setting. **Am. J. Respir. Crit. Care.** 152:355-359.
- Fuchs, F. D. & Wannmacher, L.** 1992. Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Gale, E. F., E. Cundlife, P. E. Reynolds, M. H. Richmond, M. J. Waring.** 1981. The molecular basis of antibiotic action. New York: John Wiley & Sons.
- Gilman, A. G. (Ed.).** 1990. Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Grange, J. M.** Drug resistance and tuberculosis elimination. 1990. **Bull Int Union Tuberc Lung Dis.** 65:57-69.
- Hetherington, S. V., A. S. Watson, C. C. Patrick.** 1995. Sequence analysis of the *rpoB* gene of *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 39:2164-2166.
- Heym, B.; Honoré, N.; Truffot-Pernot, C.; Banerjee, A.; Schurra, C.; Jacobs Jr, W.R.; Embden, J. D.; Grosset, J. H. & Cole, S.** Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. **The Lancet**, 344:293-297, 1994.
- Hirano, K., C. Abe, M. Takahashi.** 1999. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian Countries and their rapid detection by line probe assay. **J. Clin. Microbiol.** 37:2663-2666.

-
- Honore, N. and S. T. Cole.** 1993. Molecular Basis of Rifampin Resistance in *Mycobacterium leprae*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 37:414-418.0
- Iseman, M. D., D. L. Cohn, J. A. Sbarbaro.** 1993. Directly observed treatment of tuberculosis. **N. Engl. J. Med.** 328:-576-578.
- Jin, D. J. & C. A. Gross.** 1988. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampin resistance. **J. Mol. Biol.** 202:45-58.
- Kapur, V., L. L. Li, S. Iordanescu, M. R. Hamrick, A. Wanger, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase β subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. **J. Clin. Microbiol.** 32:1095-1098.
- Kapur, V., L-L Li, M.R. Hamrick.** 1995. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 119:131-138.
- Kim, B. J., S. Y. Kim, B. H. Park, M. Lyu, I. K. Park, G. Bai, S. Kim, C. Y. Cha, and Y. H. Kook.** 1997. Mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-Single-Strand conformation polymorphism analysis for rifampin susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.** 35:492-494.
- Klenk, H. P. & W. Zillig.** 1994. DNA-dependent RNA polymerase subunit B as a tool for phylogenetic reconstructions: branching topology of the archaeal domain. **J. Mol. Evol.** 38:420-432.
- Kochi, A., B. Vareldzis, K. Styblo.** 1993. Multidrug-resistant tuberculosis and its control. **Res. Microbiol.** 144:104-110.
- Kubín, M., M. Havelková, I. Hyncicová, Z. Svecová, J. Kaustová, K. Kremer, D. van Soolingen.** 1999. A multidrug-resistant tuberculosis microepidemic caused by genetically closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. **J. Clin. Microbiol.** 37:2715-2716

-
- Lal, R. & Lal, S.** Recent Trends in Rifamycin Research. **BioEssays**, 16:211-216, 1994.
- Levin, M. E. & G. F. Hatfull.** 1993. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. **Mol. Microbiol.** 8:277-285.
- Lewin, Benjamin.** Genes VI.1997. New York: Oxford University Press and Cell press.
- Mandell, G. L.; J. E. Bennett, R. Dolin.** (Ed.). 1995. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 4. ed. New York.
- Matsiota-Bernard, P., G. Vroni, and E. Marinis.** 1998. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. **J. Clin. Microbiol.** 36: 20-23.
- McAdam, R. A., P. W. M. Hermans, D. van Soolingen, Z. Zainuddin, D. Catty, J. D. A. van Embden, J. W. Dale.** 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to IS3 family. **Mol. Microbiol.** 4:1607-1613.
- McClure, W. R., C. L. Cech.** 1978. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. **J. Biol. Chem.** 253:8949-8956.
- Mello, F C. Q.** Avaliação da utilidade clínica da pesquisa de ADN do *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica de PCR em lavados broncoalveolares para o diagnóstico da tuberculose paucibacilar. Rio de Janeiro, UFRJ. Faculdade de Medicina, 1998.
- Miller, L. P., J. T. Crawford, and T. M. Shinnick.** 1994. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 38:805-811.
- Mitchison, D. A.** 1985. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy **Tubercle** 66:219-226.
- Moghazeh, S. L., X. Pan, T. Arain, C. K. Stover, J. M. Musser, B. N. Kreiswirth.** 1996. Comparative antimicrobial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. **Antimicrob Agents Chemother.** 40:2655-2657.

- Mollet, C., M. Drancourt, D. Raoult.** 1998. Determination of *Coxiella burnetii* *rpoB* sequence and its use for phylogenetic analysis. **Gene.** 207:97-103.
- Moulding, T.** Pathogenesis, pathophysiology, and immunology. In: SCHLOSSBERG, D. **Tuberculosis**, 2. ed. New York, 14-21, 1989.
- Murrey, C. J. L.** 1994. Issues in Operational, social, and economic research on tuberculosis. Global burden of tuberculosis. In: Bloom, B. R. (Ed.). **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.** Washington: ASM Press, 1994.
- Musser, J. M.** 1995. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. **Clin. Microbiol. Rev.** 8:496-514.
- Nash, K. A., A. Gaitan, C. Inderlied.** 1997. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by means of a rapid, simple, and specific RNA/RNA mismatch assay. **J. Infect. Dis.** 176:533-536.
- Netto, A. R.** 1999. Impacto da reforma do setor saúde sobre os serviços da tuberculose no Brasil. **Bol. Pneumol. San.** 7(1):8-18.
- Niemann, S., Rüsç-Gerdes, S., and Richter, E.** 1997. IS6110 Fingerprinting of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Germany during 1995. **J. Clin. Microbiol.** 35:3015-3020.
- Ohno, H., H. Koga, S. Kohno, T. Tashiro, and K. Hara.** 1996. Relationship between Rifampin MICs for and *rpoB* Mutations of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Japan. **Antimicrob. Agents Chemother.** 40:1053-1056.
- Ohno, H., H. Koga, T. Kuroita, K. Tomono, K. Ogawa, K. Yanagihara, Y. Yamamoto, J. Miyamoto, T. Tashiro, and S. Kohno.** 1997. Rapid Prediction of Rifampin Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 155:2057-2063.
- Ovchinnikov, Y. A., G. S. Monastyrskaya, V. V. Gubanov, S. O. Gurey, O. Y. Chertov, T. V. Modyanov, U. A. Makarova, T. V. Marchenko, I. N. Polovnikova, V. M. Lipkin, E. D. Sverdlov.** 1981. The primary structure of

-
- Escherichia coli* RNA polymerase: nucleotide sequence of the *rpoB* gene and amino-acid sequence of β -subunit. **Eur. J. Biochem.** 116:621-629.
- Quan, S, H. Venter, E. R. Dabbs.** 1997. Ribosylative inactivation of rifampin by *Mycobacterium smegmatis* IS6110 a principal contributor to its low susceptibility to this antibiotic. **Antimicrob. Agents Chemother.** 41:2456-2460.
- Pechère, J. C. (Ed.)** 1996. Intracellular Bacterial Infections. Cambridge: British Library, 1 ed.
- Rachek, L. I., A. M. Tucker, H. H. Winkler, D. O. Wood.** 1998. Transformation of *Rickettsia prowazekii* to rifampin resistance. **J. Bacteriol.** 180:2118-2124.
- Ramaswamy, S., J. M. Musser.** 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. **Tuber. Lung Dis.** 79:3-29.
- Rastogi, N. & David, H. L.** Mechanism of pathogenicity in mycobacteria. **Biochimie**, 123, 1988
- Rattan, A., A. Kalia, and N. Ahmad.** 1998. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. **Emerg. Infect. Diseases.** 42:195-207.
- Raviglione, M. C., D. E. Sinder and A. Kochi.** 1995. Global epidemiology of tuberculosis – Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **JAMA** 273:220-226.
- Riley, L. W.** Drug-resistant tuberculosis. **Clin. Inf. Dis.**, 17:S442-446, 1993.
- Rinder, H., P. Dobner, K. Feldmann.** 1997. Disequilibria in the distribution of *rpoB* alleles in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Germany and Sierra Leone. **Microbiol. Drug Resist.** 3:195-197.
- Rossau, R., H. Traore, H. Beenhouwer, W. Mijs, G. Jannes, P. Rijk, and F. Portaels.** 1997. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. **Antimicrob. Agents Chemother.** 40: 2093-2098.

- Santos, D. S.** Antimicrobianos: mecanismos de ação e mecanismos de resistência em bactérias e vírus. In: SOARES, P. R. B.; BERTUOL, M. **Infecções clínico-cirúrgicas em ginecologia.** Porto Alegre: Artes Medicas, 1996.
- Scarpellini, P., S. Braglia, A. M. Brambilla, M. Dalessandro, P. Cichero, A. Gori, and A. Lazzarin.** 1997. Detection of Rifampin Resistance by Single-Strand Conformation polymorphism Analysis of Cerebrospinal Fluid of Patients with Tuberculosis of the Central Nervous System. **J. Clin. Microbiol.** 35:2802-2806.
- Sinder, D. E.; Raviglione, M.; Kochi, A.** 1994. Global burden of tuberculosis. In: Bloom, B. R. (Ed.). **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.** Washington: ASM Press.
- Small, P. M., P. C. Hopewell, S. P. Singh, A. Paz, J. Parsonnet, D. C. Ruston, G. F. Schecter, C. L. Daley, and G. K. Schoolnik.** 1994. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. **N. Engl. J. Med.** 330:1703-1709.
- Small, P.M. & J. D. A. Van Embden.** 1994. Molecular epidemiology of tuberculosis. In: Bloom, B. R. (Ed.). **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.** Washington: ASM Press.
- Smith, P. G. & Moss, A. R.** 1994. Epidemiology of tuberculosis. In: Bloom, B. R. (Ed.). **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.** Washington: ASM Press.
- Sepkowitz, K. A., J. Raffalli, L. Riley, T. E. Kiehn, D. Armstrong.** 1995. Tuberculosis in the AIDS Era. **Clin. Microbiol. Rev.** 8:180-199.
- Taniguchi, H., H. Aramaki, Y. Nikaido.** 1996. Rifampin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 144:103-108.
- Telenti, A., F. Imboden, F. Marchesi, T. Schmidheini, and T. Bodmer.** 1993a. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. **Antimicrob. Agents Chemother.** 37:2054-2058.

- Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M. J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, and T. Bodmer.** 1993b Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Lancet** 341: 647-650, 1993.
- Telenti, A., N. Honoré, C. Bernasconi, J. March, A. Ortega, B. Heym, H. E. Takiff, T. Cole.** 1997. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. **J. Clin. Microbiol.** 35:719-723.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering.** 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiology in America. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 18:426-439.
- Thierry, D. M., M. D. Cave, K. D. Eisenach, J. T. Crawford, J. H. Bates, B. Gicquel, J. L. Guesdon.** 1990. IS6110, an IS-like element of *M. tuberculosis* complex. **Nucleic. Acid. Res.** 18:188.
- van Deutekom, H., J. J. J. Gerristen, D. van Soolingen, E. J. C. van Ameijden, J. D. A. , R. A. Coutinho.** 1997. A molecular epidemiological approach to studying the transmission of tuberculosis in Amsterdam. **Clin. Infect. Dis.** 25:1071-1077.
- van Embden, J. D. A., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. W. M. Hermans, C. Martín, R. Mcadam, T.M. Shinnick, and P. M. Small.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J. Clin. Microbiol.** 31:406-409.
- van Soolingen, D., P. E. W. de Haas, P. W. M. Hermans, P. M. A. Groenen, J. D. A. van Embden.** 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** 29:2578-2586.
- Zhang, G., E. A. Campbell, L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov, S. A. Darst.** 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. **Cell** 98:811-824.

- Zhang, Y.; B. Heym, B. Allen, D. Young, S. Cole. 1992. The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance of *M. tuberculosis*. **Nature**, 385:591-593, 1992.
- Zhang, Y. & D. Young. 1994. Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Antimicrobial Chem.**, 34:313-319.
- Ward, E. S. & Young, L. Y. Tuberculosis. In: **Applied Therapeutics. The clinical use of drugs**. 3. ed. Spokane: Applied Therapeutics, 1993.
- Watterson, S. A., S. M. Wilson, M. D. Yates, and F. A. Drobniewski. 1998. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** 36: 1969-1973.
- Whelen, A. C., T. A. Felmlee, J. M. Hunt, D. L. Williams, G. D. Roberts, L. Stockman, D. H. Persing. 1995. Direct Genotype Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Rifampin Resistance in Clinical Specimens by using Single-Tube Heminested PCR. **J. Clin. Microbiol.** 33:556-561.
- Williams, D. L., C. Waguespack, K. Eisenach, J. T. Crawford, F. Portaels, M. Salfinger, C. M. Nolan, C. Abe, V. Stich-Groh, and T. P. Gillis. 1994. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.** 38:2380-2386.
- Williams, D. L., L. Spring, L. Collins. 1998. Contribution of *rpoB* mutations to the development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 42:1853-1857.
- World Health Organization. 1994. Tuberculosis Programme. Framework for effective tuberculosis control. Geneva, Switzerland: World Health Organization/TB/97.225.
- World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 1994-1997. Geneva, Switzerland: WHO Global Tuberculosis Program, 1997; report n° WHO/TB/97.229.
- World Health Organization (a). World health report 1999: making a difference. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999.

Yuen, L. K. W., Leslie, D., and Cole, P. 1999. Bacteriological and Molecular Analysis of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Australia. **J. Clin. Microbiol.** 37:3844-3850.

9. Anexos

Anexo 01 Abreviações dos aminoácidos

Aminoácido	Nomes abreviados	
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Anexo 02 Soluções e Tampões

1. Clorofórmio/álcool isoamílico
 - Clorofórmio 24 V
 - Álcool isoamílico 1V

2. Fenol-clorofórmio
 - Solução de fenol saturado na concentração de 1:1 (v/v) com clorofórmio.

3. Lisozima
 - Solução a 50 mg/ml em Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. Estocada a -20°C.

4. Proteinase K
 - Solução de proteinase K a 10 mg/ml em água destilada. Estocada a -20°C

5. RNAase
 - Solução a 10 mg/ml em Tris-HCl 10 mM, pH 7,5/NaCl 15 mM. Estocada a -20°C

6. Solução de desnaturação
 - NaCl 1,5 M
 - NaOH 0,5 M

7. Solução de NaCl 5 M
 - NaCl 29,2 % em água tridestilada

8. Solução de neutralização
 - NaCl 1,5M
 - Tris-HCl

0,5 M, pH 8,0

9. Solução estoque de acrilamida

- acrilamida 42%
- Bisacrilamida 1,8%

10. Solução de SDS/Proteinase K (para cada amostra)

- 5 μ l de Proteinase K 10mg/ml
- 70 μ l de SDS 10%

11. Solução de CTAB/NaCl

- NaCl 4,1%
- CTAB (N-cetil-N,N,N-trimetil brometo de amônio) 10%

12. SSC 20X

- NaCl 3M
- Citrato de sódio 0,3M

13. Tampão de amostra 5X para DNA

- Ficoll 400 15%
- Xileno cianol FF 0,25%
- Azul de bromofenol 0,25%

14. Tampão de amostra com RNase

- Glicerol 50%
- Tris-Cl 50 mM (pH 7,5)
- EDTA 5 mM
- Azul de bromofenol 0,05%
- RNase 30 μ g/ml

15. Tampão de lavagem primária

- Uréia 36%

- SDS 4%
- SSC 20X, 2,5%

16. Tampão de lavagem secundária

- SSC 2X

17. Tampão 10X de reação de PCR

- Tris-HCl 100 mM, pH 8,3
- KCl 500 mM
- MgCl₂ 15 mM
- Gelatina 0,1% (w/v)

18. Tampão TE

- Tris-HCl 10mM, pH 8,0
- EDTA 0,1 mM, pH 8,0

19. Tampão TEB 10X (Tris-borato-EDTA)

- Tris-OH 890 mM
- EDTA 2,5 mM
- Ácido bórico 890 mM
- pH 8,2

Anexo 03 Esquema terapêutico indicado nos casos novos de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar, exceto meningite

Fases do tratamento	Fármacos	Peso do doente			
		Até 20 kg	Mais de 20 kg e até 35 kg	Mais de 35 kg e até 45 kg	Mais de 45 kg
		mg/kg/dia	mg/dia	mg/dia	mg/dia
Primeira fase	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	Z	35	1000	1500	2000
Segunda fase	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400

Observações:

a) No tratamento da associação tuberculose e portador de HIV ou paciente com SIDA, a segunda fase terá a duração de 7 meses (2RHZ/7RH).

b) R: rifampicina; H: isoniazida; Z: pirazinamida (siglas adotadas pela organização Mundial de Saúde) (BRASIL, 1995).

Anexo 04 Esquema terapêutico indicado nos casos de retratamento em recidivantes e retorno após abandono do esquema anterior

Fases do tratamento	Fármacos	Peso do doente			
		Até 20 kg	Mais de 20 kg e até 35 kg	Mais de 35 kg e até 45 kg	Mais de 45 kg
		mg/kg/dia	mg/dia	mg/dia	mg/dia
Primeira fase	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	Z	35	1000	1500	2000
	E	25	600	800	1200
Segunda fase	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	E	25	600	800	1200

Observações:

a) Os recidivantes de esquemas alternativos por toxicidade ao esquema I devem ser avaliados para prescrição de esquema individualizado.

b) R: rifampicina; H: isoniazida; Z: pirazinamida; E: etambutol (siglas adotadas pela organização Mundial de Saúde) (BRASIL, 1995).

Anexo 05 Esquema terapêutico indicado nos casos de falência de tratamento com os esquemas anteriores

Fases do tratamento	Fármacos	Peso do doente			
		Até 20 kg	Mais de 20 kg e até 35 kg	Mais de 35 kg e até 45 kg	Mais de 45 kg
		mg/kg/dia	mg/dia	mg/dia	mg/dia
Primeira fase	S	20	500	1000	1000
	Et	12	250	500	750
	E	25	600	800	1200
	Z	35	1000	1500	2000
Segunda fase	Et	12	250	500	750
	E	25	600	800	1200

Observações:

a) S: estreptomicina; Et: etionamida; Z: pirazinamida; E: etambutol (siglas adotadas pela OMS) (BRASIL, 1995).

Anexo 06 Sequência de nucleotídeos de *Mycobacterium tuberculosis* da linhagem H37Rv clivada com Sac I, seguida da sequência de aminoácidos deduzidos da subunidade β e dos aminoácidos da porção terminal desta subunidade. O gene *rpoB* inicia na posição 1065 e termina na posição 4598.

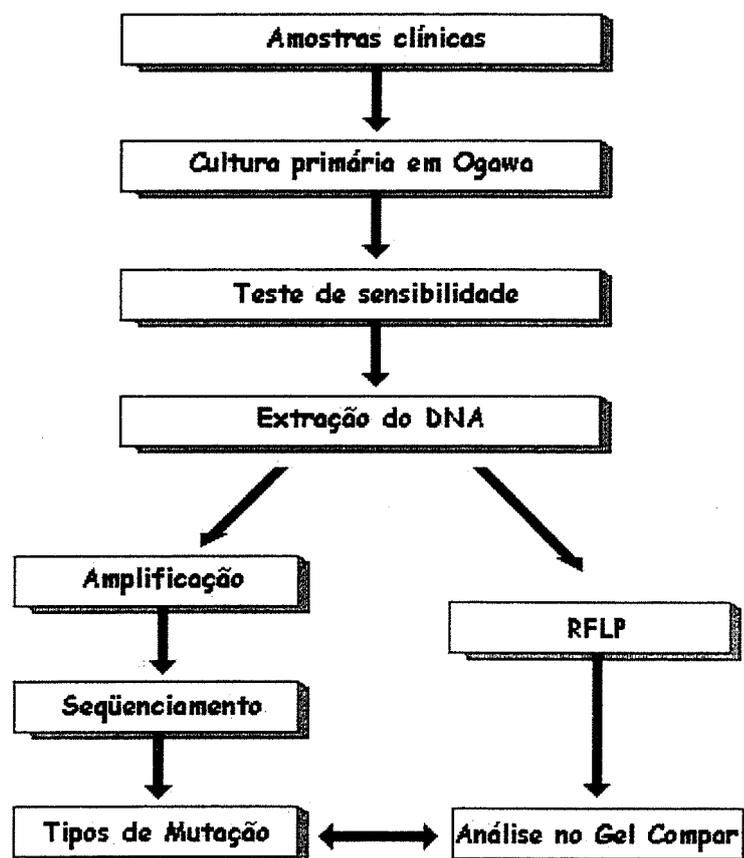
1 GAGCTCGCAAAGCGCTCGGCCGACCCGCGCCTACCGATGAACACTCAACGACTTGGCCGGTACATACCTCGACGACCTGTGACCGAGGGCGAGGTTCGGGTAGGCCTGCTAGATACGTCGG
 121 TCTTATTGGCCGCGAGAGCGCGGTGCAATCGCGGACCTGCTGAACCGGTGGCCCTTTCGGTATGACGATCGGTGAGCTGCAACTCGGTCTGCTCAATGCTGGCGATTTCGGCGACCCG
 241 ATCAGCAGCGCCGACACCTCGCGTAGCCGCTAGCCGACCGCCGATCAGATCCCTTCAGTGAAGCGGTGATGATTTCGTTGGCTCGACTCGTCGGCGACTGCGGAGCCGCGGGCGTGGCGG
 361 GTCGGTGAAGCTGACCGAGCCTCTCATTCGGGCAACCGCGGAGATCAAGGTGTGACACCGAGGACTGATGAAGTGCCTGCACCTCGCTGATGCTGACGTCACGATGCCCGTGAAG
 481 CGTGGTATCGCCCGGGAGCTTTCGGGTGGTGGTCCAGCTTGTTCGTTGGTGGGTCGAGCTGCTGGTGGAGGCCAGGAGCTGCTGTGCACCGCGGATGATCGATTTCGACCCGAT
 601 CCATCTGGAGCTACTGCCCCAGACCGGACTCGCAGCCTTGGCAAGCGCTACCGGGGCACTTCACCTGAGGCAACGAAGGGCGCTATGCCGCGATTGGGGTGGTCAACCGGAGGACT
 721 TGACGGCAGACGCTAAACGGGTCAATCTGTTGGGAGCATGCGCCGATGTGGCCAAAGGAGTGCAGATCGCCAGCTAGCCCGATATCCGGGGATGGTTATTGCCGGGTATTGAGGA
 841 ATGCCCGCTCTCGCCTATTGTTGGACGTTGCGCTGCTACTTCTGCCACCTCACCCGCCACTTGACACCGTGGTCTTAGTCTGAGCCAGTTTGGCGGCTCAGCGGTTTAGTTCGGT

RBS V) L E G C I

961 CGTGAGATCCGACAGATGTTCCGCGCCGAAACCGGACAAAATTATCGCGGGAACGGCCCGTGGCCACCGCTCTCTAAGGGTCTCGTTGGTCCGATGAAGTGTGGAAGGATGCA
 L A D S R Q S K T A A S P S P S R P Q S S N N S V P G A P N R V S F A K L R E
 1081 TCTTGGCAGATTCCCGCCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCTAGTCCGAGTCGCGCCGAAAAGTTCCTCGAATAACTCCGTAACCGGAGCGCAAAACCGGGTCTCCTTCGCTAAGLTCGCGG
 P L E V P G L L D V Q T D S F E W L I G S P R W R E S A A E R G D V N P V G G L
 1201 AACCACTTGGGTTCCGGGACTCTTGACGCTCCAGCCGATTCGTTTCGAGTGGCTGATCGGTTCCGCGCGCTGGCCGAAATCCGCGCCGAGCGGGGTGATGTCAACCCAGTGGGTGGCC
 E V L Y E L S P I E D F S G S M S L S F S D P R F D D V K A P V D E C K D D
 1321 TGAAGAGGTGCTCTACGAGCTGTCTCCGATCGAGGACTTCTCCGGTTCGATGTCGTTGTCGTTCTCTGACCTCGTTTCGACGATGTCAGGCAACCGCTCGAGGAGTCAAGACAAGG
 M T Y A A P L F V T A E F I N N N T G E I K S Q T V F M G D F P M M T E K G T F
 1441 ACATGAGCTACGCGGCTCCACTGTTTCGTCACCGCCGAGTTTCAATCAACAACAACACCGGTGAGATCAAGAGTTCAGAGGCTGTTTCATGGTGACTTCCCGATGATGACCGGAGAAGGCGACT
 I I N G T E R V V V S Q L V R S P G V Y F D E T I D K S T D K T L H S V K V I P
 1561 TCATCATCAACGGGACCGAGCGTGTGGTGGTCCAGCAGCTGGTCCGGTCCCGGGGTGACTTCGACGAGACCATGACAAGTCCACCGCAAGACCGCTGCACAGCGTCAAGGTGATCC
 S R G A W L E F D D K R L D T V G V R I A C T R K R R Q P V T V L L K A L F G W T S E
 1681 CGAGCCGCGCGGTGGTTCGATTGACGTCGACAAGCCGACCGCTCGCCGCTCGCCATCGACCGCAACCGCGCAACCGGTCACCGGTCCAGGCTCAAGCGCGTGGGGTGGACCCGCG
 Q I V E R F G F S E I M R S T L E K D N T V G T D E A L L D I Y R K L R P G E P
 1801 AGCAGATTGTCGAGCGGTTTCGGGTTCTCCGAGATCGCAATCGACGCTGGAGAAGGACAACACCGCTCGGACCGGAGCGGCGCTGTTGGACATACCGCAAGCTGCGTCCGGCGGAGC
 P T K E S A Q T L E N L F F K E K R Y D L A R V G R Y K V N K K L G L H V G E
 1921 CCCGACCAAGAGTACGCGAGCTGTTGGAAAAGTTCCTTCAAGGAGAAGGCTACGACCTCGCCCGGTCGCTAAGGTCAACAAGAAAGTTCGGGCTGACATGTCGGCGG
 P I T S S T L T E E D V V A T I E Y L V R L H E G Q T I M T V P G G V E V P V E
 2041 AGCCCATACGCTCGACGCTGACCGAAGGAGCGTGGTGGCCACCATTCGGAATATCTGGTCCGCTTCACGAGGGTCAGACCCAGTACCGGTTCCGGGGCGCGTCCGAGTGGCGGTGG
 T D D I D H F G N R R L R T V G E L I Q N Q I R V G H S R G E R V R E R M T I
 2161 AAACCGACGACATCGACCACTTCGCAACCGCCGCTCGCTACGGTCCGGGAGCTGATCAAAACAGATCCGGGTCCGCGATGTCGCGGATGGAGGGGTGGTCCGGGAGCGGATGACCA
 Q D V E A I T P Q T L I N I R P V V A A I K E F F G T S Q L S Q F M D Q N N P L
 2281 CCCAGGAGTGGAGCGATACACCGCAGCGTGTGATCAACATCCGCGCGGTGGTCCGCGGATCAAGGATTCCTTCGCGACCGAGCTGAGCCAAATTCATGACCAGAAACACCCGCG
 S G L T H K R R L S A L G P G G L S R E R A G L E V R D V H P S H Y G R M C P I
 2401 TGTCCGGGTTGACCCACAAGCCGACGCTGTCGCGCGTGGGGCCGCGCGGCTGTCACGTCAGCGCTGCCGGGCTGGAGGTCCGCGACGTCACCCCGTCCGACTACGGCCGATGTCGCCGA
 E T P E G P N I G L I G S L S V Y A R V N P F F G F I E T P Y R K V D G V S D
 2521 TCGAAACCCCTGAGGGGCCAACATCGGTCTGATCGGCTCGCTGTCGGTGTACGCGCGGTCACCCGTTCCGGTTCATCGAAACCGCGTACCGCAAGTGGTGCAGCGCGTGGTATGGG
 E I V Y L T A D E E D R H V V A Q A N S P I D A D G R F V E P R V L V R R K A G
 2641 ACGAGATCGTGTACCTGACCCGACGAGGAGGACCGCCAGCTGGTGGCACAGGCCAATTCGCGGATCGATCGGACCGGCTCGCTTCGTCGAGCCGCGGCTGCTGTCGCGCCGCAAGGCGG
 E V E Y V P S S E V D Y M D V S P R Q M V S V A T A M I P F L E H D D A N R A L
 2761 GCGAGTGGAGTACGTCGCTGAGTGGACTACATGGAGTCTCGCCCGCCAGATGGTGTCCGTCGACCACCGCGATGATTCCTTCCGGAGCAGCAGCAGCCAAACCGTCCGCCC
 M G A N R M Q V I P L V E D M P F L A D G T G M E L R A A I D A T S S S Q E S
 2881 TCATGGGGCAAACTCAGCGCGGTGCGCGTTCGCTAGCGAGGCGCCGCTGGTGGGACCGGAGTCCGCGCGGATCGACCGCGGACGTCGCTGCTCGCAAGAAA
 G V I E V S A D Y I T V H D N G T R T R T Y R M R K F A R S N H G T C A N Q C
 3001 GCGCGTCTCAGGAGGTTGTCGGCCGACTACATCACTGTGATGCACGACAACCGCCAGCCCGGCTACCTACCGGATGCGCAAGTTTCCCGGTTCAACCCAGCGCACTTCGCGCAACCGAGT
 P I V D A G D R V E A G Q V I A G C P T G T D D G G E M A L G K N L L V A I H P W E
 3121 CCCCATCTGGTACCGCGGACCGGAGCTCGAGGCGGTGAGTCCGCGAGGTCCTACTGACGAGCGGAGATGGCGCTGAGCAAGAACCTGCTGGTGGCCATCATGCGCGTGGG
 G H N Y E D A I I L S N R L V E E D V L T S I H I E E H E I D A R D T K L G A E
 3241 AGGGCCACAATACGAGGACCGGATCATCTGTCACACCGCTGGTTCGAAAGGAGGCTGCTCACTTCGATCCACATCGAGGAGCATGAGATCGATGCTCCGCGACCAACAGCTGGGTGGCG
 E I T R D I P N I S D E V L A D L E R G I E R G I V R I G A E V R D G D I L V G K V T
 3361 AGGAGATCACCCCGCAGATCCCGAACATCTCCGACGAGTGTCTCCGACCTGGATGAGCGGGCATCGTGGCATCGGTGCCGAGGTTCCGCGAGGGGACATCTGTTGGCAAGGTCA
 P K G E T E L L T P E E R L L T L R A I F G E K A R E V R D T S L K V P H G E S G K V
 3481 CCCCGAAGGTTGAGACCGAGTGCACCCGAGGAGCGGCTGCTGCGATTCCTCGGTGAGAAAGCCCGGAGTGCAGGACACTTCGCTGAAGTTGCCGACCGCGAATCCGCGCAAGG
 I G I R V F S R E D E D E L P A G V N E L V R V Y V A Q K R K I S D G D K L A G
 3601 TGATCGCATTCGGGTGTTTCCCGCGAGGACGAGGACGAGTTCGCGCGCGGTGTCACAGGCTGGTGGCTGTGATGTGGCTCAGAAACCGAAGATCTCCGACCGGTGACAAGCTGGCCG
 R H G N K G V I G K I L P V E D M P F L A D G T P V D I I L N T H G V P R R M N
 3721 GCGCGCAGCGCAACGAGGCGTGTGATCGGCAAGATCCTGCGCGTTCGAGGACATGCCGTTCTTCCGCGACCGCCGCGGTTGGACATTATTITGAACACCGCGCGTGGCCGACGGATGA
 I G Q I L E T H L G W C A H S G W K V D A A K G V P D W A A R L P D E L E A H
 3841 ACATCGCCAGATTTCGAGACCCCTGGGTTGGTGTGCCACAGCGGCTGGAAGGTGCGACCGCCGCAAGGGGTTCCGGACTGGGCGCCAGGCTCCCGCAGCAACTGCTCGAGGCGC
 A N A I V S T P V F D G A Q E A E L Q G L L S C T L P N R D G D V L V D A D G K
 3961 ATCGCAACGCCAATGTTGTCGACGCGGTTTCGACCGCGCCAGGAGCGGAGCTGCAAGGCGTGTGTCGTCGACCGCTGCCCAACCGGACCGTGCAGTGTGTTGACGCGGAGCGGCA
 A M L F D G R S G E P F P P Y T V G Y M Y I M K L H H L V D D K I H A R S T G
 4081 AGGCCATGCTTCGACCGCGCAGCGGCGAGCCGTTCCCGTACCCGCTCAGGTTGGCTACATGATCATGAAGTGCACCACTGGTGGACGACAAGATCCAGCCCGCTCCACCG
 P Y S M I T Q O P L G G K A Q F G G Q R F G E M E C W A M Q R Y G A A Y T L Q E
 4201 GCGGCTACTCGATGATCAGCCAGCAGCGCTGGCGGTAAGGCGAGTTCGGTGGCCAGCGGTTCCGGGAGATGGAGTGTGGGCAATGACGCGCTACGGTGTGCTACACCTGCAAGG
 L T L I K S D D T V G R V K V Y E A I V K G E N I P E P G I P E S F K V L L K E
 4321 AGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTCCGCGCGTCAAGGTTGACGAGCGGATTCGTCGAGGGTGAAGACATCCCGGAGCCGCGCATCCCGGAGTCCGTTCAAGGTTGCTGCTCAAG
 L Q S L C L N V E V L S S D G A A I E L R E G E D E D L R A A A N L G I N L S
 4441 AACTGCTCGCTCAACGCTCAGGTCGATTCGAGTACGCGGTGCGCGGATCGAACTGCGCGAAGGTGAGGACGAGGACCTGGAGCGGGCCGCGCAACCTGGGAATCAATCTGT
 R N E S A S F E D L A * RBS V L D V N F F D E L R I G L
 4561 CCCGCAAGTAATCCGCAAGTTTCGAGGATCTTCGGTAAAGGCTTCGCAAAATTAATAACCCGTTAGGAAAGGGAGTTACGTTGCTCGACGTCACCTTCTTCGATGAACTCCGATCCGCTG
 A T A E I R Q W S Y G E V T K P E T I N Y R T L K P E K D G L F C E K I F G P
 4681 TTGCTACCGCGGAGGACATCAGCAATGGTCTATGGCGAGGTCAAAAAGCCGGAGACGATCAACTACCGCAGCTTAAGCCGGAGAAGGACGGCGCTGTTCTGCGAGAAGATCTTCGGGC
 T R D W E C Y C G K Y K R V R F K G I C E R C G G V E V T R A K V R R E R M H G
 4801 CGACTCGGACTGGAAATGCTACTGCGCAAGTACAAGCGGTCGCTTCAAGGGCATTATTCGCGAGCGCTGGCGGTCGAGGTGACCCCGCAAGGTCGCTGTTGAGCGGATGGCC
 I E L A A P V T H I W Y F K G V P S R L G Y L L D L A P K D L E K I I Y F A A Y
 4921 ACATCGAGCTTCCCGCGCCGTCACCCACATCTGGTACTTCAAGGGTGTGCCCTGCGCGGTGGGGTATCTGCTGGACCTGGCCCGAAGGACCTGGAGAAGATCATCTACTTCCGCTGCC
 V I T S V D E M E R H N E A L
 5041 ACGTGATCACCTCGGTCGACGAGGAGATGCGCCACAATGAGCTC

Anexo 07 Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos da subunidade β de M. tuberculosis com a de M. leprae, E. coli e cloroplastos de tabaco. O asterisco indica os aminoácidos idênticos nas três subunidades β bacterianas e o ponto indica substituição de aminoácidos

M. tub. VLEGCILADSRQSKTAASPSRPOSSNNSVPGAPNRVSAFKLREPL.EVPGLLDVQDTSFEWLGSPRWRESAAERGDVNPVGGLEEVLYELSPIEDF
M. lep. VLEGCILPDFGQSKTDVSPSQSRPOSSPNNNSVPGAPNRISFAKLREPL.EVPGLLDVQDTSFEWLGSPCWRRAAASRGDLKPKVGGLEEVLYELSPIEDF
E. coliMVYSYTEKKRIRKDFGKRPOVL.DVPYLLSIQLDSFQKFI.....QDPEGQYGLEAAFRSVPFIQSY
TobaccoMLGDGNEGISTIPGFNOIQFEGFCRFID.....QGLTEELYKFKPKIEDT
* * * * *
M. tub. SGMSLSF..SDPRFDDVKAPVDECKDKDMTYAAPLVTAEFI.....NNNTGEIKSOTVFMGDFPMMTEKGTFFIINGTERVVVSQVLRSPGVYFDET
M. lep. SGMSLSF..SDPRFDEVKAPVEECKDKDMTYAAPLVTAEFI.....NNNTGEIKSOTVFMGDFPMMTEKGTFFIINGTERVVVSQVLRSPGVYFDET
E. coliVSYRLGEPVFDVQECQJRGVTVSAPLVRKLRVLYEREAEPTVKDIKEQEVYMGELPLMTDNGTFVINGTERVVSQVLRSPGVYFDS
Tobacco DQEIFQLFVETYQLVEPLIKERDAVYESLTYSSLEYVAGLIW.....KNSRDMQEQTIFIGNIPLMNSLGTISVNGIYRIVINQILQSPGIYYRSE
* * * * *
M. tub. IDK..STDKTLHSVKVPSRGAWLEFDVDRKRTVGVRIIDRKRKQPVTVLLKALGWTSEQI.....
M. lep. IDK..STDKTLHSVKVPSRGAWLEFDVDRKRTVGVRIIDRKRKQPVTVLLKALGWTSEQI.....
E. coliPYRGSWLDDEFDPKDNLFVRIDRRRKLPTATILRALNYTTEQIIDLDFEKFVIFEIRDNKLMELVPERLGETASFDIEANGK
Tobacco LDH.....NGISVYTGTIISDWGGRSELEIDRKARIWARVSRKQKISILVSSAMGLNREIL.....
* * * * *
M. tub.VERFGFSEIMRSTL...EKDNTV
M. lep.TERFGFSEIMRSTL...EKDNTV
E. coli VYVEKGRRITARHIRQLEKDDVKLIEVPVEYIAGKVVAKYIDESTGELICANMELSLDLLAKLSQSGHKRIETLFTNDLDHGPYISETL...RVDPTN
TobaccoENVCYPEIFLSFLSDKERKKIG
* * * * *
M. tub. GTDEALLDIYRKL..RPGEPTKESAQTLLLENLFFKEKRYDLARVGRYKVNKGLGHVGEPISSSTLTEDDVVATI EYLVRRLHEGQTTMTVPGGVEVPVE
M. lep. GTDEALLDIYRKL..RPGEPTKESAQTLLLENLFFKEKRYDLARVGRYKVNKGLGHVGEPISSSTLTEDDVVATI EYLVRRLHEGQTTMTVPGGVEVPVE
E. coli DRLSALVEIYRMM..RPGEPTREAASLFFSEDRYDLAVGRMKFN..SLLREEIEGSGILSKDDIIDVMKKLDIRNGK.....E
Tobacco SKENALIEFYQQFACVGGDPVFSSELCCKELQKFF..QQRCELGRIGRNMNRRLNDIPQ..NNTFLPRDILAADHLIGLKFMGAL.....
* * * * *
M. tub. TDDIDHFGNRRRLRTVGLIQNIRVGMRSRMERVVRRMTTQDVEAI..TPQTLINIRPVVAAIKKEFFGTSQLSQFMQDNNPLSGLTHKRRLSALGPGLS
M. lep. TDDIDHFGNRRRLRTVGLIQNIRVGMRSRMERVVRRMTTQDVEAI..TPQTLINIRPVVAAIKKEFFGTSQLSQFMQDNNPLSGLTHKRRLSALGPGLS
E. coli VDDIDHFGNRRIRSVGMAENQFRVGLRVERAVKERLSLGLDRTL..MPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMQDNNPLSEITHKRRISALGPGLT
Tobacco .DDMNHLLKKNRIRSVADLLQDFGLALVRLLENVVRKTCGAIIRKHLIPTQNLVTSPLTTTYESFFGLHPLSQVLDRTNPLTQVHGRKLSYLGGLT
* * * * *
M. tub. RERAGLEVRDVHPSHYGRMCP IETPEGPNIGLIGLSVYARVNPFGFIETPYRKVDGVVSDIEIYLTADEEDRHVVAQANSPIDAGRFRVPRVLRVK
M. lep. RERAGLEVRDVHPSHYGRMCP IETPEGPNIGLIGLSVYARVNPFGFIETPYRKVDGVVSDIEIYLTADEEDRHVVAQANSPIDAGRFRVPRVLRVK
E. coli RERAGFEVRDVHPTHYGRVCP IETPEGPNIGLINSLSVYQNTNEYGLETPTPYRKVDGVVSDIEIYLSAIEEGNYVVAQANSNDEEGHFVEDLVCRSK
Tobacco GRTASFRIRDVHPSHYGRICPIDTSEGINVQLVPSGLAIHARIGHLSGAEVYFVSEISERSTGVRMLYSPGRDESGALAIAREGRVYVYTTNDKILL...
* * * * *
M. tub. AGEVEYVPSSEVDYMDVSPRQMVSVATAMIPFLEHDDANRALMGMANMORQAVPLVRSSEAPLVGTGMELRAAIDAA..TSSSQESQVIEEVSADYITVM...
M. lep. AGEVEYVPSSEVDYMDVSPRQMVSVATAMIPFLEHDDANRALMGMANMORQAVPLVRSSEAPLVGTGMELRAAIDAGHVVAEKSGVIEEVSADYITVM...
E. coli .GESSLFRDQVDYMDVSTQVVSVASLIPFLEHDDANRALMGMANMORQAVPLVRSSEAPLVGTGMELRAAIDAGHVVAEKSGVIEEVSADYITVM...
Tobacco RQEFLLTIAWEQVHLRISFPYFQVLSGASLIPFIEHNDANRALMGMANMORQAVPLVRSSEAPLVGTGMELRAAIDAGHVVAEKSGVIEEVSADYITVM...
* * * * *
M. tub. ...HDNGTRRTYRMRKFAFSNHGT CANQCP IVDAGDRVEAGQVIADGPTDDEGEMALGKLLVAIMPWEG..HNYEDAILSNRLVEEDVLTSHIEEHE
M. lep. ...ADDGTRRTYRMRKFAFSNHGT CANQSP IVDAGDRVEAGQVIADGPTDDEGEMALGKLLVAIMPWEG..HNYEDAILSNRLVEEDVLTSHIEEHE
E. coli DEMYPGEAGIDYINLTKYTRSNQNTCINQMPCVSLGEPVPERGVDLADGPSTDLGELALQNMVAFMPWNG..YNFEDSILVSRVQEDRFTTIIHQELA
Tobacco ...AGNGDILSIPLVYIKRKNNTCMHQQLVPRGKCIKGGQILADGSLVGGELALGKLLVAIMPWEG..YNSDAVLI SERLYEDVLTSHIEEHE
* * * * *
M. tub. IDARDTKLGAEEITRDI PNISDEVLDLDERGIVRIGAEVRDGDILVGVKTPKG..ETELTPEERLLRAIFGEKAREVDRDTSKLVPHGESGKVIIGRVFS
M. lep. IDARDTKLGAEEITRDI PNISDEVLDLDERGIVRIGAEVRDGDILVGVKTPKG..ETELTPEERLLRAIFGEKAREVDRDTSKLVPHGESGKVIIGRVFS
E. coli CVSRDITKLGPEEITADIPNVGEAALS KLDESGIVYIGAEVTTGGDILVGVKTPKG..ETQLTPEEKLLRAIFGEKASDVKSSLRVNVGVSQVTVIDVQVFT
Tobacco IQTHVTSQGPVKVTEIPIHLEAHLRLNLDKNGIVMLGSSWVETGDILVGLKTPQVVKESYAPEDRLLRAILGIQVSTSKETCLKLP IGGRRVIVDRVHIQ
* * * * *
M. tub. RE.....
M. lep. HE.....
E. coli RDGVEKDKRALEIEEMQLKQAKKDLSEELQILEAGLFSRIRAVLVAGGVAEKLDKLPDRDRLWELGLTDEEKONQLEQLAEQYDELKHEFEKLEAKRRK
Tobacco KRGGSSYNP
* * * * *
M. tub. ..DEDELPAVGNELVRVYVAQKRKISDGDKLAGRHGNKGVIGKILPVEDMPFLADGTPVDIILNTHGVPRRMNIGQILETHLWGCAHS.....
M. lep. ..DDDELPAVGNELVRVYVAQKRKISDGDKLAGRHGNKGVIGKILPVEDMPFLADGTPVDIILNTHGVPRRMNIGQILETHLWGCAHS.....
E. coli ITQGDLLAPGVKLVKIVYLAVKRRIQPGDKMAGRHNKGVISKINPIEDMPYDENGTPVDIILNTHGVPRRMNIGQILETHLGMAAKIGDKINAMLKQQ
TobaccoETIRVYIQLKREIKVGDVAGRHGNKGIISKILPRQDMPYDENGTPVDIILNTHGVPRRMNIGQILETHLGMAAKIGDKINAMLKQQ
* * * * *
M. tub.GWKVDAAKGV...DWAARLPDELEAHAN...AIVSTPVFDGAQAEELQGLSCTLPNRDGDVLDVADGKAMLFDRSGEPFPYVPTV
M. lep.GWKVDAAKGV...DWAARLPDELEAHAN...AIVSTPVFDGAQAEELQGLSCTLPNRDGDVLDVADGKAMLFDRSGEPFPYVPTV
E. coli QEVAKLREFIQRAYDLGADVROKVDLSTFSDEEVMRLAENLRKGMPIATPVFDGAQAEELKELL...KLGD..LPTSGQIRLYDGRTEGQFERPVTV
TobaccoSLLDRHYRIAP.....FDERYEQEASR.....KLVFSELYEASKQTANPVVFEPEYP.....GKSRIFDGRTGNPFEQPVII
* * * * *
M. tub. GYMYIMKHLHLVDDKIHARSTGYPYSMITQQLGGKAQFGGQRFGECEWAMQAYGAAYTLQELLTIKSDDTVGRVKVYEAIVKGENIPEP.GIPESFKVL
M. lep. GYMYIMKHLHLVDDKIHARSTGYPYSMITQQLGGKAQFGGQRFGECEWAMQAYGAAYTLQELLTIKSDDTVGRVKVYEAIVKGENIPEP.GIPESFKVL
E. coli GYMYIMKHLHLVDDKMHARSTGYSYSLVTQQLGGKAQFGGQRFGECEWALEAYGAAYTLQEMLTIVKSDVNGRTKMYKNIVDGNHQMPEP.GMPESFNVL
Tobacco GKPYILKLIHQVDDKIHGRSSGHYALVTOQPLRGRKQGGQRFGECEWALEGFGVAHILQEMLTIVKSDHIRARQEVLTGTIIIGTTIPNPEDAPESFRLL
* * * * *
M. tub. LKELQSLCLNVEVLSDDGAAIELREGEDEDLERAANLGINLSRNASASFEDLA*
M. lep. LKELQSLCLNVEVLSDDGAAIELREGEDEDLERAANLGINLSRNASASFEDLA*
E. coli LKEIRSLGINIEL.....EDE.....
Tobacco VRELRSLALELNLHFLVSEKNFQINRKEA.....
1455

Anexo 08 Fluxograma das etapas do desenvolvimento do trabalho

Anexo 09 Artigo submetido ao Journal of Clinical Microbiology

1
2
3
4
5
6
7 **Mutations in the *rpoB* Gene of Multidrug-Resistant**
8 ***Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Brazil**
9

10 Andréia Rosane M. Valim^{1,2}, Maria Lucia R. Rossetti¹, Marta O. Ribeiro¹, Arnaldo Zaha^{2*}
11

12 ¹Laboratório Central do Rio Grande do Sul
13 Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
14 Rua Domingos Crescêncio, 132,
15 Porto Alegre – Rio Grande do Sul
16 CEP 90130-001 - Brazil
17

18 ²Centro de Biotecnologia
19 Universidade Federal do Rio Grande do Sul
20 Av. Bento Gonçalves, 9500
21 Porto Alegre- Rio Grande do Sul
22 CEP 91501-970 – Brazil
23
24
25
26

1. * Corresponding author. Mailing address: Centro de Biotecnologia/UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, CEP 91501-970 Porto Alegre - RS, Brazil. Phone: +55 51 316-6070. Fax: +55 51 319 1079. Email: zaha@dna.cbiot.ufrgs.br

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

ABSTRACT

Mutations in a 69-bp region of the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* are associated with rifampin resistance (Rif^R). We have studied 100 *M. tuberculosis* isolates from three States of Brazil, eighty-two of which were resistant to rifampin. A 157-bp fragment containing the 69-bp region of the *rpoB* gene was analyzed. A single-base substitution occurred in 68 Rif^R isolates. The amino acids changes most frequently observed in point mutations were in codons 531, 526, and 516, with frequencies of 53%, 20%, and 7%, respectively. Double-base substitution (in the same codon) occurred in 4 Rif^R isolates (5%). Mutation in two separate codons occurred 4 times (5%), and mutations associated with deletion were found in 2 isolates. One isolate had 4 codons deletion. Twenty-one different kinds of mutations were identified in 82 Rif^R isolates, six of which had not been reported previously. We did not find any mutation in the 69-bp region of three Rif^R isolates. We did not detect any mutation in the same region of eighteen rifampin sensitive isolates. We have also analyzed 55 of these isolates by restriction fragment length polymorphism (RFLP) based on IS6110. They revealed that in Brazil, multidrug resistant *M. tuberculosis* were comprised of a diverse set of strains, and that, in some cases, strains with certain *rpoB* mutations were associated with specific IS6110 RFLP profiles.

INTRODUCTION

1
2 According to the World Health Organization, 8 million cases of tuberculosis (TB)
3 occur each year, resulting in 3 million deaths (22). Strains of *Mycobacterium tuberculosis*
4 resistant to at least 2 drugs, such as rifampin and isoniazid are considered multidrug-resistant
5 (MDR-TB). These multidrug resistant strains arise by sequential acquisition of resistance
6 conferring mutations in several genes, as a consequence of antibiotic selection. This situation
7 causes great concern worldwide because of the prolonged infectivity which increases the risk
8 of transmission (1).

9 Rifampin is one of the most important chemotherapeutic agents used to combat
10 infections by *M. tuberculosis* and can be assumed to be a surrogate marker for MDR-TB (5,
11 21). Resistance to this drug has been shown to be due to alteration of the target molecule, the
12 β subunit of RNA polymerase (10, 27). This putative rifampin resistance is associated with
13 mutations that occur within a highly conserved region of the *rpoB* gene, that encodes the β -
14 subunit of RNA polymerase. The types of mutations include single nucleotide changes and
15 inframe deletions and insertions (16, 27, 33).

16 Although automated sequencing has been unambiguously applied to characterize
17 mutations associated with rifampin resistance, a number of other techniques such as PCR-
18 SSCP (6, 12, 28), dideoxy fingerprinting (6), heminested PCR (32), PCR heteroduplex
19 analysis (33), and line probe hybridization (4, 3, 23, 31) has been successfully applied to
20 detect the mutations. In the case of rifampin, the presence of mutations appears to be fully
21 predictive of resistance. However, this is not necessarily the case with other genes
22 associated with drug resistance, since mutations not associated with any significant change
23 in the phenotype also occur.

1 In this study, we have used DNA sequencing to characterize mutations in a
2 hypervariable region of the *rpoB* gene. We sequenced 82 rifampin resistant *M. tuberculosis*
3 isolates from three States of Brazil (Rio Grande do Sul – RS, São Paulo – SP, and Rio de
4 Janeiro -RJ). Some of the isolates were also characterized by examination of their IS6110
5 restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns in order to verify possible
6 relationships among the isolates and *rpoB* mutations.

MATERIALS AND METHODS

Isolates used. A total of 100 *M. tuberculosis* isolates from different States of Brazil were analyzed by sequencing. From Rio Grande do Sul, 38 rifampin-resistant (Rif^R) and 16 rifampin-sensitive (Rif^S) clinical isolates were isolated in the Laboratório Central do Rio Grande do Sul. From Rio de Janeiro, 26 samples were obtained from the Centro de Referência Professor Hélio Fraga (25 Rif^R, and 1 Rif^S). Twenty isolates were provided by Instituto Adolfo Lutz and Faculdade de Ciências Farmacêuticas Araraquara, both in São Paulo State (19 Rif^R and 1 Rif^S). The samples were collected during the period 1996-1998.

Culture and susceptibility testing. Cultures were carried out on Ogawa medium. Rifampin susceptibility was determined on Löwestein-Jensen medium by the proportional method of Canetti et al. (2). The isolates were also tested for susceptibility to isoniazid, ethambutol, pyrazinamide, and streptomycin by the same method (see Table 1).

Sample preparation and PCR. A loopful of bacteria was suspended in 500 µl of TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) and the DNA was extracted using CTAB as described previously (30). The DNA (10 µl) extracted from the bacterial suspensions was used for amplification of a 157-bp region of the *rpoB* gene from nucleotide 1846 to 2002 (GenBank accession n° U12205) with primers TR9 (5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT) and TR8 (5'-TGCACGTCGCGGACCTCCA) by the protocol described by Telenti et al. (27). The PCR mixture (50 µl) contained 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 3 mM MgCl₂, 200 µM (each) dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, primers (0.5 µM each), and 2.5 U of Taq DNA Polymerase (Cenbiot). The reaction was subjected to a 3 min pre-PCR heating step at 95°C, followed by 25 PCR cycles of 1 min each at 95, 65, and 72°C, and a final 4 min extension at

1 72°C in a thermal cycler (MiniCycler™, M. J. Research Inc.). In order to analyze the PCR
2 product, 10 µl of the reaction solution were electrophoresed on a 1.5% agarose gel containing
3 0.5 µg/ml of ethidium bromide. The presence of a 157-bp band indicated a successful
4 amplification. Precautions to avoid false-positive results were taken in every assay, as
5 described previously (13).

6
7 **Nucleotide sequencing.** Purified *M. tuberculosis* DNA from the clinical isolates and
8 reference strain H₃₇RV was used to produce a 157-bp fragment of *rpoB* gene by using the
9 primers and PCR conditions described above. The unincorporated nucleotides and primers
10 were separated from the amplified DNA using the MicroSpin™ Columns (Pharmacia
11 Biotech). Sequencing was carried out with Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator
12 Cycle Sequencing kit (Amersham) according to the manufacturer's instructions. For each
13 sample the sequence was examined twice in one direction, using as template the products of
14 two independent amplification reaction.

15
16 **IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Fingerprinting.**
17 IS6110 RFLP typing was conducted by an internationally standardized method (30). Briefly,
18 chromosomal DNA was obtained from each isolate and digested with *Pvu*II. The DNA
19 fragments were separated by electrophoresis, transferred to a nylon membrane, and
20 hybridized to a DNA probe corresponding to the right portion of IS6110. Hybridizing bands
21 were identified by enhanced chemiluminescence (Amersham), and the patterns were
22 compared visually and by using GelCompar computer software (Version 4.2, Applied Maths,
23 Katrijk, Belgium). The isolates with indistinguishable RFLP patterns were classified as

1 belonging to the same cluster and the isolates that differed by one or two bands was
2 considered to be genetically related (29).

3

4 **Nucleotide sequence accession numbers.** The new alleles found in this study have
5 been deposited in GenBank under accession n° AF143771, AF146567, AF147030,
6 AF147031, AF147033, and AF147034.

1 RESULTS

2 Mutations of *rpoB* gene in Rif^r *M. tuberculosis*.

3 **Rio Grande do Sul State.** In this group DNA sequence analysis of 38 resistant
4 isolates revealed 9 different kinds of missense mutations within a 157-bp region of the *rpoB*
5 gene. All isolates had a single-point mutation, and the highest frequency of mutation was
6 observed in the codon Ser-531 (55%). Point mutations in codons 526 (29%), 516 (8%), 511
7 (3%), and 522 (3%) were also observed (Table 2). We found no mutations in the 157-bp *rpoB*
8 segment sequenced from one Rif^R isolate, and 16 Rif^S isolates.

9 **São Paulo State.** Twenty *M. tuberculosis* isolates (19 Rif^R and one Rif^S) were
10 available for DNA sequence analysis. No mutations were observed in the segment sequenced
11 from the Rif^S isolate, whereas single point mutations were detected in 18 of the isolates with
12 resistant phenotype. Seven different kinds of nucleotide substitution were revealed in four
13 codons of *rpoB* gene. The mutations were located in codon 531 (58%), and in codon 526
14 (26%). Two samples had changes of two bases in the same codon. Mutations in codon 522
15 (5%) and 533 (5%), were also detected (Table 2). One *M. tuberculosis* isolate reported to
16 have the rifampin resistant phenotype contained no mutation within the region of the *rpoB*
17 gene examined in this study.

18 **Rio de Janeiro State.** Evaluation of 26 *M. tuberculosis* isolates (25 Rif^R, 1 Rif^S) from
19 Rio de Janeiro State identified 10 mutations within a 157-bp region of the *rpoB* gene
20 affecting 12 amino acids in this region. Sixteen presented one point mutation in codons 531
21 (52%), 516 (8%), and 513 (4%), while one isolate (4%) had a 4-codon deletion (Tyr-515,
22 Leu-516, Val-517, Leu-518), and another isolate contained a point mutation (Gln-513) and 3-
23 codon deletion (Lys-514, Tyr-515, Leu-516). Four Rif^R isolates (16%) of *M. tuberculosis*
24 contained point mutations in two separate codons resulting in two amino acid substitutions

1 for each isolate (Ser-513 and Phe-514; Leu-511 and Met-515; Ser-531 and His-526; Leu-511
2 and Asp-516). One isolate had point mutation in three separate codons (Leu-524, Tyr-525,
3 His-526) and one-codon deletion (Table 2). Another *M. tuberculosis* isolate reported to have
4 the rifampin resistant phenotype contained no mutations within the 157-bp region of the *rpoB*
5 gene examined in this study.

6 **General Analysis.** Twenty-one different types of mutations were identified in 82 Rif^R
7 *M. tuberculosis* clinical isolates, six of which had not been reported before (Table 2). Most of
8 them were single nucleotide mutations (81%) involving seven codons. Eleven isolates (13%)
9 exhibited more complex mutations. No silent substitutions were observed in the *rpoB* gene
10 region examined for any of the *M. tuberculosis* isolates analyzed in this study. The codons
11 most frequently affected by point mutations were 531, 526, and 516, with frequencies of
12 54%, 21%, and 7%, respectively. Although codon 526 was the second most affected, in Rif^R
13 isolates from Rio de Janeiro no mutation was observed in this codon only. No mutations were
14 revealed in the *rpoB* segment sequenced from eighteen Rif^S isolates. Three Rif^R isolates (4%)
15 contained no mutations in this sequenced region, although these isolates were resistant to
16 rifampin by the proportional method.

17 **RFLP analysis.** Fifty-five *M. tuberculosis* isolates (50 rifampin-resistant and 5
18 rifampin-sensitive) were also studied by RFLP analysis with IS6110 as a hybridization probe.
19 The goal was to determine the degree of epidemiological independence and association
20 between *rpoB* mutation with IS6110 RFLP patterns. The number of IS6110 copies in the
21 isolates varied from 4 to 25 (average 11), and a total of 43 RFLP patterns was identified.
22 From these, 4 patterns were observed in 5 susceptible isolates and 39 in the 50 resistant
23 isolates. It was possible to observe in this work, that isolates with the same *rpoB* mutation can
24 have distinct RFLP patterns and that isolates with the same RFLP patterns can have distinct
25 *rpoB* mutations.

1 However, we identified some isolates showing the same RFLP pattern and the same
2 kind of mutation in the *rpoB* gene. Three different SP State isolates (PR15, PR10, and PR06)
3 had an IS6110 pattern arbitrarily designated type Q, and showed the same mutation in codon
4 531 (all from Instituto Adolfo Lutz). Other three isolates from RS (RS6562, RS6756, and
5 RS7083) and one from SP States (PR26) displayed a single RFLP pattern, which we called A,
6 and had mutation in codon 531. However, in two isolates from RS State (RS6562 and
7 RS6756) a less frequent mutation (TCG-531-TGG) was observed. Five isolates from RS
8 State (RS7256, RS7453, RS7253, RS6577, and RS6965) showed the pattern D and four of
9 these had the same mutation in codon 531.

10 Among the isolates with mutation in codon 526, there were three from RS State that
11 showed the same RFLP pattern, designated D1. Other isolate also showed the pattern D1, but
12 had mutation at codon 522 (TCG→TTG). The patterns D (9 bands) and D1 (8 bands) were
13 clonally related, they shared 8 bands. The other strains analyzed did not present cluster
14 patterns.

15 The strains from SP and RS States seemed to be genetically closer than the RJ State
16 strains. In the RJ group there were 19 isolates that were distributed into 19 RFLP patterns.
17 When we analyzed the isolates by State, we found that the RJ isolates had no cluster pattern,
18 while in the isolates from the other states clustering was feasible (Fig 1).

19

20

DISCUSSION

Rifampin resistant or multidrug-resistant *M. tuberculosis* strains have become a newly emerging problem. Rifampin resistance can be regarded as a possible marker of multidrug resistance (12). The use of molecular biology-based techniques to detect Rif^r is more rapid and therefore of greater help to select adequate multidrug regimens and may contribute to minimizing the spread of drug-resistant strains (24).

In this study, we described several characteristic mutations in the *rpoB* gene of *M. tuberculosis* isolated in Brazil expanding the geographic area studied to date (3, 11,15, 19,35).

The presence of mutations in a restricted region of the *rpoB* gene has been found in more than 96% of *M. tuberculosis* strains with various levels of rifampin-resistance (6, 11, 20, 27, 33). While more than 20 distinct missense mutations within the 69-bp hypervariable region of *rpoB* accounting for rifampin resistance in *M. tuberculosis* have been reported (17), two of these mutations (Ser₅₃₁→Leu and His₅₂₆→Tyr) account for ≥ 65% (61% in our study) of rifampin resistance (11, 27, 28). These substitutions were considered important to the acquisition of rifampin resistance, and it is clear that these two amino acids are critical sites for this characteristic.

In our study we observed that 82% of the *M. tuberculosis* isolates with the Rif^R phenotype contained missense mutations which led to amino acids substitution at Ser₅₃₁ (54%), His₅₂₆ (21%), and Asp₅₁₆ (7%) residues. Similar mutations and frequencies of codon substitution in Rif^R *M. tuberculosis* have been reported previously (11, 15, 24, 26, 27). Other missense mutations, as well as deletions were found in 21% of the Rif^R *M. tuberculosis* strains. Another characteristic finding was the high frequency of double mutations occurring in two separate codons (16%) in the Rio de Janeiro isolates. In the same group of isolates,

1 two had a combination of point mutations with deletion of one or more codons
2 (CAA(Gln₅₁₃)→CAC(His), Del Lys₅₁₄, Tyr₅₁₅, and Leu₅₁₆; TTG(Leu₅₂₄)→TGG(Trp),
3 AAC(Tyr₅₂₅)→CCC(Pro), CAC(His₅₂₆)→CAG(Gln), and Del Phe₅₂₇), and one isolate
4 contained deletion of four codons (Tyr₅₁₅, Leu₅₁₆, Val₅₁₇, and Leu₅₁₈).

5 Isolates from RS and SP States showed some similarity in the mutation frequencies.
6 Only single missense mutations occurred, some in codon 526, others in 531. In the latter,
7 almost all showed the same kind of mutation, while the ones in codon 526 (16 isolates from
8 both States) showed eight different types of mutation. Samples from RJ State showed a wider
9 range of mutations including those within two codons simultaneously (4 cases), deletions
10 associated with point mutation in the same isolate (2 cases), and simple deletion of 12
11 nucleotides in one isolate. Some of the mutations observed in RJ isolates were not found in
12 other isolates analyzed in this work and in isolates from other published studies. Interestingly
13 no mutation only in codon 526 was observed in RJ isolates.

14 Sequence analysis identified no mutation in three of the isolates tested, although these
15 isolates were resistant to rifampin. Similar observation has been reported by others (11, 15,
16 27) and suggest that mutations located outside of the region of analysis can result in rifampin
17 resistance. Another possibility is that in these resistant strains, changes have occurred in
18 genes whose products participate in antibiotic permeation or metabolism (11). No silent
19 mutations were observed in the sequenced region of rifampin-susceptible or -resistant *M.*
20 *tuberculosis* isolates in this analysis.

21 No association was found between particular mutations in the *rpoB* gene and drug
22 susceptibility patterns of multidrug-resistant *M. tuberculosis* isolates, supporting the view that
23 the mutations leading to rifampin resistance are independent events unrelated to these
24 mutations affecting the development of resistance to the others antibiotics tested (33).

1 We have attempted to identify an association between Rif^R mutations and the RFLP
2 patterns of the *M. tuberculosis* isolates tested in this study. The results showed that mutations
3 affecting the Ser₅₃₁, His₅₂₆, and Arg₅₁₆ codons were found in several different RFLP patterns.
4 Drug-resistant *M. tuberculosis* isolates exhibiting the same RFLP patterns contained different
5 mutations in the *rpoB* gene, and most isolates with the same mutation exhibited different
6 RFLP patterns. But, in some cases, mutations in the *rpoB* gene could be correlated with
7 RFLP profiles, indicating recently-acquired infection.

8 Population-based studies using molecular strain typing technique based on IS6110
9 analysis for *M. tuberculosis* isolates enable new cases of TB to be more reliably classified.
10 Specifically, a RFLP cluster pattern isolate is considered to represent a recently acquired
11 infection and a non-cluster isolate with a unique RFLP pattern is considered to represent TB
12 resulting from reactivation of infection acquired in the remote past (7, 18, 25). We observed
13 that 29% of all isolates analyzed had cluster RFLP patterns, suggesting TB incidence from
14 recent infection in the population. Two cluster, D and D1, were classified as genetically
15 related, because they had RFLP profile differing in only one band. However, no cluster
16 pattern was observed in the isolates from RJ.

17 In this study, we identified mutations in rifampin-resistant *M. tuberculosis* strains
18 from Brazil that were commonly found in strains from other parts of the world. We found six
19 new alleles, four of them in isolates from RJ. One possible explanation for this result could
20 be the fact that the rate of drug therapy abandon is very high in RJ State (8).

21 Genetic resistance in *M. tuberculosis* to RIF occur in a very low rate ($1/10^8$) in drug-
22 free environments (9), suggesting that this kind of drug resistance is generally induced by
23 inappropriate therapy (1). In Brazil, according to WHO surveillance (34), acquired resistance
24 to RIF is around 6%. Acquired resistance could be explained by the emergence of new types
25 of mutations in isolates from both recent and reactivated infections. The most important

1 factors that could contribute to acquired drug resistance are inadequate drug therapy and non
2 compliance by patients during the therapy (14).

3 The results presented in this work suggest that differences found in the isolates from
4 RJ compared to isolates from SP and RS, like the absence of mutation in codon 526, deletion
5 of one or more codons are due to differences in the chemotherapeutic treatment and therapy
6 abandon among different states.

7 The implantation of Direct Observed Therapy System – DOTS, as suggested by
8 WHO, is urgent to avoid development of new resistant strains and decrease the transmission
9 of MDR strains, helping in control TB more effectively.

1 **ACKNOWLEDGEMENTS**

2 We thank Angela M. W. Barreto from Instituto Prof. Hélio Fraga, Maria Alice Telles
3 from Instituto Adolfo Lutz, Clarice Q. F. Leite from USP-Araraquara for kindly providing
4 the *Mycobacterium tuberculosis* isolates and for availability to help. We also thank Dr.
5 Lee Riley for his invaluable advice.

6 This investigation received financial support from Fundação de Apoio à Pesquisa do
7 Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
8 Tecnológico (CNPq). Part of this work was also supported by Fogarty International Center,
9 National Institute of Health, USA (TW 00905).

REFERENCES

- 1
2 1. **Bifani, P. J., B. B. Plikaytis, V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, M. L. Lutfey, S. L.**
3 **Moghazeh, W. Eisner, T. M. Daniel, M. H. Kaplan, J. T. Crawford, J. M. Musser, B.**
4 **N. Kreiswirth.** 1996. Origin and interstate spread of New York City multidrug-resistant
5 *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA* **275**:452-457.
- 6 2. **Canetti, G. W. Fox, A. Khomenko, H. T. Mahler, N. K. Menon, D. A. Mitchison, N.**
7 **Rist, and N. A. Smeley.** 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug
8 sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull. W. H.*
9 *O.* **41**:21-43.
- 10 3. **Cooksey, R. C., G. P. Morlock, S. Glickmans, and J. T. Crawford.** 1997. Evaluation
11 of line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant
12 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York city. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1281-
13 1283.
- 14 4. **De Benhouwer, H. Z. Lhiang, G. Jannes, W. Mijis, L. Machtelinckx, H. Rossau.**
15 1995. Rapid Detection of Rifampin Resistance in Sputum and Biopsy Samples from
16 Tuberculosis Patients by PCR and Line Probe Assay. *Tubercle and Lung Diseases*
17 **76**:425-430.
- 18 5. **Drobniewski, F. A. and S. M. Wilson.** 1998 .The rapid diagnosis of isoniazid and
19 rifampicin resistance resistance in *Mycobacterium tuberculosis* – a molecular story. *J.*
20 *Med. Microbiol.* **47**:189-196.
- 21 6. **Felmlee, T. A., Q. Liu, A. C. Whelen, D. Williams, S. S. Sommer, and D. H. Persing.**
22 1995. Genotypic Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Rifampin Resistance:
23 Comparison of Single-Strand Conformation Polymorphism and Dideoxy Fingerprinting.
24 *J. Clin. Microbiol.* **33**:1617-1623.

- 1 7. **Ferrazoli, L., M. Palaci, L. R. M. Marques, L. F. Jamal, J. B. Afiune, E. Chimara,**
2 **M. C. Martins, M. A. S. Telles, C. A. F. Oliveira, M. C. Palhares, D. T. A. Spada, L.**
3 **Riley.** 2000. Transmission of Tuberculosis in an Endemic Urban Setting in Brazil. *Int J*
4 *Tuberc Lung Dis.* 4:1-8.
- 5 8. **Fortes, A. and M. P. Dalcomo.** 1997. Tuberculose Multirresistente. *Pulmão.* 6(2):68-80.
- 6 9. **Grange, J. M.** Drug resistance and tuberculosis elimination. 1990. *Bull Int Union Tuberc*
7 *Lung Dis.* 65:57-69.
- 8 10. **Honore, N. and S. T. Cole.** 1993. Molecular Basis of Rifampin Resistance in
9 *Mycobacterium leprae.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:414-418.0
- 10 11. **Kapur, V., L. L. Li, S. Iordanescu, M. R. Hamrick, A. Wanger, B. N. Kreiswirth,**
11 **and J. M. Musser.** 1994. Characterization by automated DNA sequencin of mutations in
12 the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase β subunit in rifampin-resistant
13 *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J. Clin. Microbiol.*
14 32:1095-1098.
- 15 12. **Kim, B. J., S. Y. Kim, B. H. Park, M. Lyu, I. K. Park, G. Bai, S. Kim, C. Y. Cha, and**
16 **Y. H. Kook.** 1997. Mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* that
17 interfere with PCR-Single-Strand conformation polymorphism analysis for rifampin
18 susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 35:492-494.
- 19 13. **Kwok, S. and R. Higuichi.** 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-
20 238.
- 21 14. **Mahmmoudi, A. and M. D. Iseman.** 1993. Pitfalls in the care of patients with
22 tuberculosis. Common errors and association with the acquisition of drug resistance.
23 *JAMA* 270:65-68.

- 1 15. **Matsiota-Bernard, P., G. Vrioni, and E. Marinis.** 1998. Characterization of *rpoB*
2 mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece.
3 *J. Clin. Microbiol.* **36**: 20-23.
- 4 16. **Miller, L. P., J. T. Crawford, and T. M. Shinnick.** 1994. The *rpoB* gene of
5 *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:805-811.
- 6 17. **Musser, J. M.** 1995. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular
7 Genetic Insights. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:496-514.
- 8 18. **Niemann, S., Rüsç-Gerdes, S., and Richter, E.** 1997. IS6110 Fingerprinting of Drug-
9 Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Germany during 1995. *J. Clin.*
10 *Microbiol.* **35**:3015-3020.
- 11 19. **Ohno, H., H. Koga, S. Kohno, T. Tashiro, and K. Hara.** 1996. Relationship between
12 Rifampin MICs for and *rpoB* Mutations of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated
13 in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1053-1056.
- 14 20. **Ohno, H., H. Koga, T. Kuroita, K. Tomono, K. Ogawa, K. Yanagihara, Y.**
15 **Yamamoto, J. Miyamoto, T. Tashiro, and S. Kohno.** 1997. Rapid Prediction of
16 Rifampin Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*
17 **155**:2057-2063.
- 18 21. **Rattan, A., A. Kalia, and N. Ahmad.** 1998. Multidrug-Resistant *Mycobacterium*
19 *tuberculosis*: Molecular Perspectives. *Emerg. Infect. Dis.* **42**:195-207.
- 20 22. **Raviglione, M. C., D. E. Sinder and A. Kochi.** 1995. Global epidemiology of
21 tuberculosis – Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* **273**:220-226.
- 22 23. **Rossau, R., H. Traore, H. Beenhouwer, W. Mijs, G. Jannes, P. Rijk, and F. Portaels.**
23 1997. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the

- 1 simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to
2 rifampin. Antimicrob. Agents Chemother. **40**: 2093-2098.
- 3 **24. Scarpellini, P., S. Braglia, A. M. Brambilla, M. Dalessandro, P. Cichero, A. Gori,**
4 **and A. Lazzarin.**1997. Detection of Rifampin Resistance by Single-Strand Conformation
5 polymorphism Analysis of Cerebrospinal Fluid of Patients with Tuberculosis of the
6 Central Nervous System. J. Clin. Microbiol. **35**:2802-2806.
- 7 **25. Small, P. M., P. C. Hopewell, S. P. Singh, A. Paz, J. Parsonnet, D. C. Ruston, G. F.**
8 **Schechter, C. L. Daley, and G. K. Schoolnik.** 1994. The epidemiology of tuberculosis in
9 San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N.
10 Engl. J. Med. **330**:1703–1709.
- 11 **26. Telenti, A., F. Imboden, F. Marchesi, T. Schmidheini. and T. Bodmer.** 1993. Direct,
12 automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase
13 chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. Antimicrob.
14 Agents Chemother. **37**:2054-2058.
- 15 **27. Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M. J. Colston, L. Matter,**
16 **K. Schopfer, and T. Bodmer.**1993 Detection of rifampicin-resistance mutations in
17 *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet **341**: 647-650, 1993.
- 18 **28. Telenti, A., N. Honoré, C. Bernasconi, J. March, A. Ortega, B. Heym, H. E. Takiff,**
19 **T. Cole.** 1997. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in
20 *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. J. Clin.
21 Microbiol. **35**:719-723.
- 22 **29. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering.** 1997. How to select and interpret
23 molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a

- 1 review for healthcare epidemiology in America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **18**:426-
2 439.
- 3 **30. Van Embden, J. D. A., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B.**
4 **Gicquel, P. W. M. Hermans, C. Martín, R. Mcadam, T.M. Shinnick, and P. M.**
5 **Small.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting:
6 recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* **31**:406-409.
- 7 **31. Watterson, S. A., S. M. Wilson, M. D. Yates, and F. A. Drobniewski.** 1998.
8 Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in
9 *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1969-1973.
- 10 **32. Whelen, A. C., T. A. Felmlee, J. M. Hunt, D. L. Williams, G. D. Roberts, L.**
11 **Stockman, D. H. Persing.** 1995. Direct Genotype Detection of *Mycobacterium*
12 *tuberculosis* Rifampin Resistance in Clinical Specimens by using Single-Tube
13 Heminested PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**:556-561.
- 14 **33. Willians, D. L., C. Waguespack, K. Eisenach, J. T. Crawford, F. Portaels, M.**
15 **Salfinger, C. M. Nolan. C. Abe, V. Stich-Groh, and T. P. Gillis.** 1994. Characterization
16 or rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*
17 **38**:2380-2386.
- 18 **34. World Health Organization.** Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The
19 WHO/TUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. 1997.
20 World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 21 **Yuen, L. K. W., Leslie, D., and Coloe, P.** 1999. Bacteriological and Molecular Analysis of
22 Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Australia. *J. Clin.*
23 *Microbiol.* **37**:3844-3850.

TABLE 1. Resistance patterns of MDR *M. tuberculosis* isolates from Brazil

Isolates ^a	Resistance ^b
RS7591 ^c	(R) RMP
SP16, SP17, SP18, SP24, SP26, SP27, SP28, RJ30, RJ32, RJ38, RS02, RS34, RS40, RS6562, RS6580, RS6756, RS6965, RS7084, RS7205, RS7242, RS7365, RS7484, RS7506, RS7543, RS8029, RS8142, RS8183, RS8187	(R) RMP, INH
SP22, SP23, SP25, RJ35, RJ53, RS28, RS36, RS6886, RS7753, RS8117	(R) RMP, INH, SM
SP03, SP04, SP06, SP07, SP10, SP11, SP15, RJ39, RJ50, RS6565, RS8001	(R) RMP, INH, PZA
RS57, RS6782, RS7180	(R) RMP, INH, BEM
SP08, RJ41, RJ48, RS6573	(R) RMP, INH, SM, PZA
RJ44, RS7681	(R) RMP, INH, SM, BEM
SP13, RJ54, RS7704	(R) RMP, INH, PZA, ETH
RS7253, RS7256, RS7454	(R)RMP, INH, EMB, ETH
RJ49	(R) RMP, INH, SM, PZA, ETH
RS07	(R) RMP, INH, SM, EMB, ETH
RJ37, RJ40, RJ51, RJ52	(R) RMP, INH, PZA, EMB, ETH
RJ29, RJ31, RJ33, RJ34, RJ46, RJ47, RJ55	(R) RMP, INH, SM, PZA, EMB, ETH
Isolates ^d	
RJ36, RS5897, RS6577, RS6569, RS6513, RS6514	(S) RMP, INH, SM, EMB, ETH
SP19	(R) INH (S) RMP, EMB, ETH
RS16, RS20, RS21, RS7619	(S) RMP, INH, PZA, BEM
RS7594	(R) INH (S) RMP, SM, EMB, ETH
RS6587, RS6676, RS6748	(S) RMP, INH, SM, PZA, EMB,
RS61025	(S) RMP, INH, SM, PZA, EMB, ETH
RS8124	(R) INH (S) RMP, SM, PZA, BEM, ETH
RS8135	(R) INH, PZA (S) RMP, SM, EMB, ETH

a. RS, isolates from RS State; RJ, isolates from RJ State; SP, isolates from SP State.

b. RMP, rifampin; INH, isoniazid; PZA, pyrazinamide; SM, streptomycin; EMB, ethambutol; ETH, ethionamide; R, resistant; S, sensitive.

c. Isolate resistant only to rifampin.

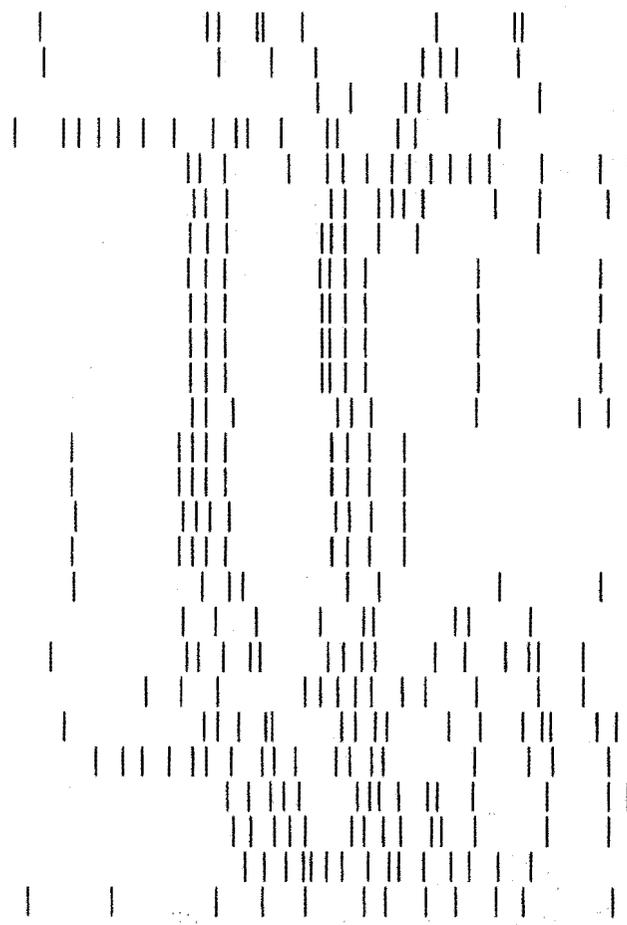
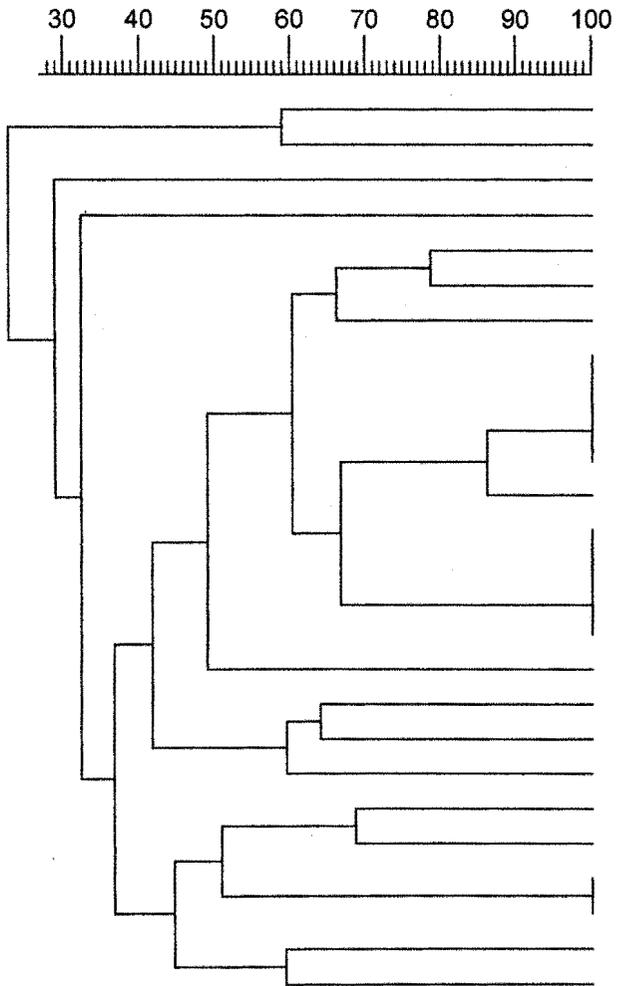
d. Isolates sensitive to rifampin.

TABLE 2. Mutations of the *rpoB* gene found in Rif^R *M. tuberculosis* isolates from Brazil.

Mutated <i>rpoB</i> codon ^a	Specific mutation	N° (%) of mutated sites / Origin of isolate
511	CTG(Leu) → CCG(Pro)	1 (1.2%)/RS
513	GAA(Gln) → CCA(Pro)	1 (1.2%)/RJ
516	GAC(Asp) → GTC(Val)	5 (6.2%)/RS and RJ
	TAC(Tyr)	1 (1.2%)/RS
522	TCG(Ser) → TTG(Leu)	2 (2.4%)/RS
526	CAC(His) → CTC(Leu)	2 (2.4%)/RS
	TAC(Tyr)	9 (11%)/RS
	CGC(Arg)	2 (2.4%)/RS and SP
	TGC(Cys) ^b	2 (2.4%)/SP
	GAC(Asp)	1 (1.2%)/SP
	CTG(Leu) ^{b, c}	1 (1.2%)/SP
531	TCG(Ser) → TTG(Leu)	41 (50%)/RS, SP, and RJ
	TGG(Trp)	3 (3.7%)/RS
533	CTG(Leu) → CCT(Pro) ^{b, c}	1 (1.2%)/SP
531 and 514	TCG(Ser) → TTG(Leu) and TTC(Phe) → GTC(Val) ^b	1 (1.2%)/RJ
531 and 526	TCG(Ser) → TTG(Leu) and CAC(His) → TGC ^c (Cys)	1 (1.2%)/RJ
511 and 516	CTG(Leu) → CGG(Arg) and GAC(Asp) → GTC(Val)	1 (1.2%)/RJ
511 and 515	CTG(Leu) → CCG(Pro) and ATG(Met) → ATA(Ile) ^b	1 (1.2%)/RJ
524, 525, 526 and del 527	TTG(Leu) → TGG (Trp), ACC(Thr) → CCC(Pro), CAC(His) → CAG(Gln), And del AAG(Lys) ^b	1 (1.2%)/RJ
513 and del 514, 515, and 516	CAA(Gln) → CAC(His) and del TTC(Phe), ATG(Met), and GAC(Asp) ^b	1 (1.2%)/RJ
Del 515, 516, 517, and 518	Del ATG(Met), GAC(Asp), CAG(Gln), and AAC(Asn) ^b	1 (1.2%)/RJ

- Codon numbers correspond to the *E. coli* numbering system for the RNA polymerase β -subunit. The mutated bases are shown in bold.
- New mutations.
- Double mutations in the same codon.
- The Rif^R isolates showing no mutation within the 69-bp hypervariable region (3/82) were not included.

FIG. 1. Schematic presentation of IS6110 RFLP patterns and dendrogram of the subcluster in rifampin-resistant *M. tuberculosis* strains isolated in RS, RJ, and SP states. All strains showed mutation in codon 531.



- E RS7506
 - IJ RJ29
 - IS RJ34
 - M RS8183
 - N SP07
 - B RS7205
 - C RS7242
 - D RS7453
 - D RS7256
 - D RS8965
 - D RS7253
 - R SP16
 - A SP26
 - A RS7083
 - A RS6756
 - A RS6562
 - IM RJ38
 - IR RJ45
 - IP RJ39
 - IQ RJ43
 - IL RJ40
 - S SP17
 - Q SP15
 - Q SP06
 - IK RJ42
- Referência 14323



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CB: BIOQUÍMICA

TÍTULO: EM ALTERAÇÕES GENÉTICAS RELACIONADAS COM A RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS”,

Autor: ANDRÉIA ROSANE DE MOURA VALIM

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Análise da dissertação: Examinar os aspectos enumerados, outorgando conceitos A (excelente), B (médio superior), C (médio inferior) e E (insuficiente).

1. Execução da parte experimental, aplicação correta de métodos adequados à solução do problema proposto;
2. Análise e aproveitamento dos resultados;
3. Revisão da Bibliografia especializada;
4. Relacionamento dos resultados obtidos com os conhecimentos atuais;
5. Apresentação geral, consistência e adequação da linguagem, uso de figuras, tabelas e gráficos.

CONCEITO: A

ASSINATURA: *Aoi Masuda*

Dra. Aoi Masuda.
Departamento de Biologia Molecular
Centro de Biotecnologia



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CB: BIOQUÍMICA

TÍTULO: EM ALTERAÇÕES GENÉTICAS RELACIONADAS COM A RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA
"MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS",

Autor: ANDRÉIA ROSANE DE MOURA VALIM

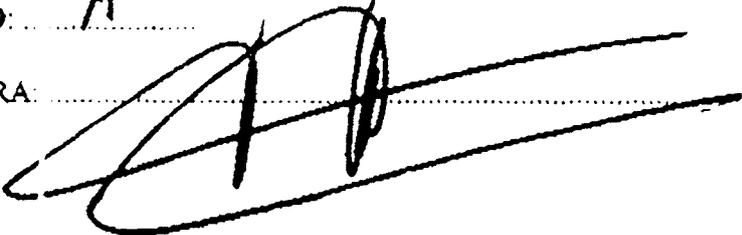
Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Análise da dissertação: Examinar os aspectos enumerados, outorgando conceitos A (excelente), B (médio superior), C (médio inferior) e E (insuficiente).

- 1 Execução da parte experimental, aplicação correta de métodos adequados à solução do problema proposto;
- 2 Análise e aproveitamento dos resultados;
- 3 Revisão da Bibliografia especializada;
- 4 Relacionamento dos resultados obtidos com os conhecimentos atuais;
- 5 Apresentação geral, consistência e adequação da linguagem, uso de figuras, tabelas e gráficos.

CONCEITO: A

ASSINATURA:



Examinador(a): Philip Noel Suffys
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Instituto Oswaldo Cruz