

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**APERFEIÇOAMENTO DE MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARA  
TUBERCULOSE E CARACTERIZAÇÃO DE *Mycobacterium  
tuberculosis* POR RFLP**

MARIA LUCIA ROSA ROSSETTI

ORIENTADOR: ARNALDO ZAHA

Tese submetida ao Curso de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas-Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como um dos  
requisitos para a obtenção do grau de Doutor.

Porto Alegre, RS, Brasil  
Abril de 1997

Parte desse trabalho está sendo publicado no artigo:

ROSSETTI, M. L.; JARDIM, S. B.; RODRIGUES, V. F. S.; MOURA, A. R.; OLIVEIRA, H.; ZAHA, A. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. **Journal of Microbiological Methods** (no prelo)

Este trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório Central do Rio Grande do Sul (LACEN/RS) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), sendo financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Programa de capacitação de Recursos Humanos para o Desenvolvimento Tecnológico (RHAE).

Ao Gelson e ao Pedro, pela compreensão, estímulo e, especialmente, carinho e amor durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas; ao meu orientador, professores, amigos, principalmente a Ludmila, Andréia, Déa, Márcia e Vivian, colegas e funcionários sem os quais este trabalho não teria sido realizado. A minha família, em especial a minha mãe pelo apoio constante. A todos de coração.

UFRGS  
BIBLIOTECA ESPECIAL DO  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1 TUBERCULOSE.....	12
1.2 <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .....	14
1.3 A TRANSMISSÃO E OS MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	15
1.4 MEDIDAS DE CONTROLE DE TB.....	17
1.5 TRATAMENTO.....	18
1.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA TB.....	19
1.6.1 <i>Métodos bacteriológicos</i> .....	19
1.6.1.1 Baciloscopia.....	19
1.6.1.2 Cultura de <i>M. tuberculosis</i> .....	20
1.6.2 <i>Método radiométrico (Sistema BACTEC)</i> .....	21
1.6.3 <i>Prova Tuberculínica</i> .....	22
1.6.4 <i>Métodos radiológicos</i> .....	22
1.6.5 <i>Imunodiagnóstico de TB</i> .....	23
1.6.6 <i>Métodos de detecção de ácidos nucleicos</i> .....	25
1.6.6.1 Sondas de ácidos nucleicos.....	25
1.6.6.2 Diagnóstico de TB por PCR.....	26
1.6.6.2.1 “Primers” mais utilizados.....	27
1.6.6.2.2 Métodos de preparação de amostra.....	29
1.6.6.2.3 Detecção dos fragmentos amplificados por PCR.....	30
1.6.6.2.4 Amplificação de DNA de amostras clínicas.....	31
1.6.6.2.5 Resultados falso negativo e positivo.....	33
1.6.6.5 Sensibilidade e especificidade da técnica de PCR.....	34
1.7 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TB.....	36
1.7.1 <i>Elementos de inserção presentes no complexo M. tuberculosis</i> .....	37
1.7.2 <i>Seqüências curtas e repetitivas de DNA</i> .....	39
1.7.3 <i>Técnicas para detecção de polimorfismo</i> .....	40
1.7.3.1 Análise de DNA por polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphism”, RFLP).....	41
1.7.3.1.1 Aplicação da técnica de RFLP em estudos epidemiológicos.....	44
1.7.3.2 Técnicas de tipificação baseadas na amplificação de ácidos nucleicos... ..	46
1.8 OBJETIVOS.....	48
1.8.1 <i>Objetivos específicos</i> .....	48
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
2.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEO.....	49
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	49
2.1.2 <i>Micobactérias</i> .....	49
2.1.3 <i>Plasmídeo</i> .....	49
2.2 ENZIMAS.....	49
2.3 “PRIMERS”.....	50
2.4 SONDAS.....	50
2.5 AMOSTRAS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO DE TB.....	50

2.6 MEIOS DE CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS.....	51
2.7 SOLUÇÕES .....	51
2.8 EXTRAÇÃO DE DNA.....	55
2.8.1 <i>Extração de DNA de culturas de micobactérias</i> .....	55
2.8.1.1 Extração com “glass beads”.....	55
2.8.1.2 Extração com CTAB.....	55
2.8.2 <i>Extração de DNA de amostras clínicas</i> .....	56
2.8.2.1 Extração por fervura .....	56
2.8.2.2 Extração com pó de vidro .....	56
2.8.3 <i>Extração de DNA plasmidial de E. coli</i> .....	56
2.9 ANÁLISE DE DNA.....	57
2.9.1 <i>Eletroforese em gel de agarose</i> .....	57
2.9.2 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i> .....	57
2.10 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA.....	58
2.11 DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	58
2.12 TRANSFERÊNCIA DE DNA DE GÉIS DE AGAROSE PARA MEMBRANAS DE NÁILON .	58
2.13 MARCAÇÃO DE DNA.....	58
2.13.1 <i>Marcação de DNA com <sup>32</sup>P</i> .....	58
2.13.2 <i>Marcação de DNA com peroxidase</i> .....	59
2.14 HIBRIDIZAÇÃO E DETECÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA .....	59
2.14.1 <i>Hibridização de DNA com sondas marcadas com <sup>32</sup>P</i> .....	59
2.14.2 <i>Hibridização de DNA com sonda marcada com peroxidase</i> .....	59
2.15 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR PCR .....	60
2.15.1 <i>Reação de amplificação</i> .....	60
2.15.2 <i>Deteção dos produtos</i> .....	60
2.16 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS POR PCR.....	61
2.17 CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR PARA O DIAGNÓSTICO DE TB .....	61
2.18 DETERMINAÇÃO DE SENSIBILIDADE DO PCR EM AMOSTRAS CLÍNICAS .....	62
2.19 CARACTERIZAÇÃO DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....	62
2.19.1 <i>Análise de DNA por RFLP</i> .....	62
2.19.1.1 Digestão de DNA extraído de culturas .....	62
2.19.1.2 Preparo das sondas.....	63
2.19.1.3 Hibridização e Deteção .....	63
2.19.1.4 Análise dos padrões gerados por RFLP .....	64
2.19.2 <i>Análise de DNA por "spoligotyping"</i> .....	64
2.19.2.1 Reação de amplificação .....	64
2.19.2.2 Hibridização e deteção .....	64
2.19.2.3 Análise dos padrões de hibridização.....	65
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
3.1 APERFEIÇOAMENTO DE MÉTODO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA TUBERCULOSE.....	66
3.1.1 <i>Seleção da região genômica para amplificação</i> .....	66
3.1.2 <i>Amplificação de DNA extraído de culturas</i> .....	66
3.1.2.1 A reação de PCR.....	66
3.1.2.2 Confirmação da seqüência amplificada.....	67
3.1.2.2.2 Análise das seqüências dos fragmentos de DNA .....	70

3.1.2.3 Análise da especificidade dos “primers” .....	70
3.1.3 Amplificação de DNA extraído de amostras clínicas .....	73
3.1.3.1 Preparação de amostras clínicas para PCR.....	73
3.1.4 Amplificação de DNA de <i>M. tuberculosis</i> em amostras clínicas usando pó de vidro .....	79
3.1.5 Sensibilidade do método de PCR estabelecido para a detecção de <i>M. tuberculosis</i> .....	82
3.1.6 Utilidade clínica do protocolo estabelecido no diagnóstico de TB.....	82
3.2 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....	86
3.2.1 Detecção de polimorfismo de DNA nos isolados de <i>M. tuberculosis</i> por RFLP86	
3.2.1.1 Padrão de clivagem dos DNAs extraídos com PvuII .....	87
3.2.1.2 Análise dos padrões de bandas obtidos por RFLP .....	87
3.2.2 Detecção de polimorfismo de DNA nos isolados de <i>M. tuberculosis</i> por “spoligotyping”.....	94
3.2.2.1 Amplificação por PCR da Região DR .....	96
3.2.2.2 Detecção dos espaçadores presente nos isolados de <i>M. tuberculosis</i> .....	97
3.2.2.3 Análise dos padrões de hibridização obtidos dos isolados .....	101
3.2.3 Comparação dos padrões de “spoligotyping” e RFLP dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> .....	101
<b>4.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>5. RESUMO.....</b>	<b>117</b>
<b>6. ABSTRACT.....</b>	<b>118</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>119</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 Análise eletroforética de produtos de PCR obtidos pela amplificação de DNA do complexo <i>M. tuberculosis</i> .....	68
FIGURA 3.2 Análise eletroforética de fragmentos de DNA Pab do complexo <i>M. tuberculosis</i> digeridos com <i>SaII</i> .....	69
FIGURA 3.3 Análise eletroforética de fragmentos de DNA de micobactérias amplificados com “primers” Pab e auto-radiografia após hibridização .....	71
FIGURA 3.4 Análise auto-radiográfica de fragmentos de DNA de diferentes micobactérias amplificados com “primers” Rep após hibridização.....	72
FIGURA 3.5 Análise eletroforética de produtos de PCR amplificados a partir de amostras de escarro.....	74
FIGURA 3.6 Auto-radiografia de produtos de PCR amplificados a partir de amostras de escarro .....	76
FIGURA 3.7 Análise eletroforética de fragmentos de DNA obtidos por amplificação de amostras de escarro e auto-radiografia dos fragmentos após hibridização.....	78
FIGURA 3.8 Análise eletroforética de produtos de PCR obtidos por amplificação de amostras de escarro tratadas por fervura e pó de vidro .....	80
FIGURA 3.9 Análise eletroforética de produtos de PCR obtidos por amplificação de amostras de sangue e soro.....	81
FIGURA 3.10 Análise eletroforética em gel de agarose de DNA cromossomal de micobactérias clivado com <i>PvuII</i> .....	88
FIGURA 3.11 Auto-radiografia dos DNAs de micobactérias obtida após hibridização com sonda IS6110, IS1081 e marcador interno.....	89
FIGURA 3.12 Padrão de bandas obtidos por RFLP de 81 DNAs de <i>M. tuberculosis</i> isolados na Rio Grande do Sul.....	93
FIGURA 3.13 Matriz de similaridade de 80 DNAs de <i>M. tuberculosis</i> isolados no Rio Grande do Sul.....	95
FIGURA 3.14 Número de cópias de IS6110 no DNA de <i>M. tuberculosis</i> isolados no Rio Grande do Sul, Bolívia e Espanha.....	96
FIGURA 3.15 Representação esquemática do princípio de amplificação de DNA dentro da região DR do complexo <i>M. tuberculosis</i> .....	98
FIGURA 3.16 Análise eletroforética em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir da região DR do DNA cromossomal de micobactérias.....	99
FIGURA 3.17 Auto-radiografia com os resultados de "spoligotyping".....	100

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1. Limite de detecção, sensibilidade e especificidade obtidos por diferentes métodos de preparação de amostra e de detecção do produto de PCR	35
TABELA 3.1 Detecção por PCR de <i>M. tuberculosis</i> em amostras clínicas antes e depois do tratamento com pó de vidro.....	84
TABELA 3. 2 Comparação entre os resultados de PCR, teste de cultura e diagnóstico clínico do paciente.....	85
TABELA 3.3 Comparação de sensibilidade e especificidade dos testes de PCR com pó de vidro e de cultura nos resultados confirmados.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

$\alpha$ - <sup>32</sup> PdATP	desoxiadenosina 5' [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] trifosfato
$\mu$ g	micrograma
AIDS	"acquired immune deficiency syndrome"
ATP	adenosina 5' - trifosfato
BCG	bacilo de Calmette e Guérin
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleotídeo 5' - trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetracético; sal sódico
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay"
HIV	"human immunodeficiency virus"
IPTG	1-isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase (1.000 pares de bases)
kDa	quilodalton: 1 kDa corresponde a 1000 Daltons
min	minuto
ng	nanograma
pb	pares de bases
PCR	"polymerase chain reaction"
RFLP	"restriction fragment length polymorphism"
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
seg	segundo
TB	tuberculose
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
triton X-100	éter octilfenólico do decaetilenoglicol
U	unidade (de atividade enzimática)
ufc	unidade formadora de colônia
UV	radiação ultravioleta
V	Volt

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que tem acometido pessoas e animais desde há muito tempo, tendo demonstrado um largo espectro de severidade que varia de indivíduo para indivíduo. Mesmo hoje, mais de cem anos após Robert Koch (1882) ter identificado o agente causador da enfermidade, ela ainda se mantém como uma das infecções crônicas de maior índice de mortalidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que morrem anualmente 3 milhões de pessoas no mundo em consequência da doença (JOINT INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION STUDY GROUP, 1982). O número de casos de TB ativa no mundo chega a 60 milhões, com 10 milhões de novos casos por ano. TB é responsável por mais de 6% de todas as mortes e 25% de todas as mortes evitáveis. Existem estimativas que ocorrerão 90 milhões de casos no mundo no ano 2000 (W.H.O., 1994).

A distribuição da TB, no entanto, não é igual em todos os continentes. A maioria dos casos, acima de 95%, ocorre em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, uma vez que a incidência da enfermidade está intimamente associada à situação sócio-econômica das diversas nações (BRASIL, 1992).

Atualmente a preocupação em torno da TB é ainda maior, em razão do aumento da incidência, mesmo em países desenvolvidos como Estados Unidos, Suíça e Itália, onde até 1986 a TB mantinha-se em declínio e agora vem crescendo. Em 1992, 26.000 casos de tuberculose<sup>®</sup> ativa foram registrados nos Estados Unidos, representando um acréscimo de 18% desde 1988. Aumentos similares foram observados em muitos países da Europa. O número de casos de TB ativa em 1990-1991 aumentou em 33% na Suíça, 30% na Alemanha, 20% na Noruega, 17% na Áustria e 9% na Holanda (KAUFMANN & VAN EMBDEN, 1993). No Brasil, apesar do número de casos se manter estável nos últimos anos (em torno de 80.000), a tuberculose continua a ser um sério problema de saúde pública. A cada hora, ocorrem aproximadamente, dez casos novos e morrem quatorze doentes por dia. Esta doença acomete principalmente pessoas nas faixas etárias correspondente à plenitude da capacidade produtiva, isto é, na faixa etária entre 20 e 49 anos (HIJJAR, 1992).

Acredita-se que a evolução da doença síndrome da imunodeficiência adquirida ("acquired immunodeficiency syndrome", AIDS) seja provavelmente, um dos principais motivos (CHAISSON, *et al.*, 1987) do aumento da TB em várias partes do mundo, principalmente das formas extrapulmonares, além do empobrecimento da população e sucateamento dos sistemas de saúde (BLOOM & MURRAY, 1992; CANTUEL, *et al.*, 1994). A destruição do sistema imunológico provocado pela doença aumenta o risco de uma infecção prévia pelo bacilo tornar-se TB clinicamente ativa e também o risco a novas infecções (HAAS & PREZ, 1994).

Em muitos países a TB tem sido uma das doenças oportunistas mais comum em pacientes com AIDS (NARAIN *et al.*, 1992). No Brasil, a ocorrência de TB associada ao vírus da AIDS ("human immunodeficiency virus", HIV), está entre 16 e 22%, constituindo-se na terceira causa mais freqüente de morte, depois da candidíase e pneumonia por *Pneumocystis carinii* (BRASIL, 1995).

A TB, conhecida desde Hipócrates como "phthisis", ocorreu provavelmente como uma doença endêmica entre os animais antes de infectar humanos e começou a espalhar-se com o aumento da densidade populacional e colonização de outros continentes. Comum nas cidades da Europa durante a metade do século XIX, de causa desconhecida e sem tratamento específico, foi a causa de muitas mortes, incluindo a de poetas e escritores famosos, o que conferiu um certo romantismo a doença (BLOOM, 1994).

Em 1882, Robert Koch provou que a TB era causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. A doença pode acometer qualquer órgão, apresentando sintomas bastante variados nem sempre especificamente relacionados com o local da infecção. Manifestações sistêmicas mais comuns da doença incluem febre, indisposição e perda de peso (TAKASHIMA *et al.*, 1990). Em aproximadamente 85% dos casos de TB o sítio envolvido é o pulmão e nos demais 15%, a TB pode estar localizada em um outro órgão (TB extrapulmonar) ou envolvendo ambos os sítios pulmonar e não pulmonar (FARER *et al.*, 1979). Essa distribuição é alterada em pacientes com AIDS. O número de TB extrapulmonar é relativamente maior. Os sítios mais comumente propensos a desenvolver TB são aqueles com melhor vascularização como o rim, meninges e pleura.

Tuberculose miliar é a forma mais séria da doença e caracteriza-se por disseminação hematogênica de um grande número de bacilos resultando em lesões granulomatosas por todo o organismo, podendo ser fatal se não tratada adequadamente (BLOOM, 1994).

### 1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose humana pode ser causada pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. africanum*. No Brasil, o principal agente causal é o *M. tuberculosis*, sendo raras as doenças pulmonares causadas por outras micobactérias, ao contrário dos países desenvolvidos, onde complicações pulmonares são mais freqüentes em decorrência de infecções com essas micobactérias (HAMPSON *et al.*, 1989).

O *M. tuberculosis*, pertencente à família Mycobacteriaceae é um dos componentes do complexo *M. tuberculosis*, juntamente com *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti* e *M. africanum*. Os bacilos dessa família possuem alto conteúdo lipídico na parede celular, podendo atingir até 40% do peso seco da célula, responsável por profundos efeitos biológicos no hospedeiro. Os bacilos são resistentes à ação de agentes químicos, mas sensíveis a agentes físicos, como radiação ultravioleta e calor.

As espécies são identificadas com base em características de crescimento, fisiológicas e bioquímicas. O estudo de propriedades adicionais como estrutura antigênica, sensibilidade a agentes químicos, susceptibilidade a micobacteriófagos e a análise de seqüências de DNA podem ser úteis na identificação. Existem até o momento mais de 60 espécies de micobactérias descritas, que compreendem as estritamente patogênicas como *M. tuberculosis* e *M. leprae*. Entre as potencialmente patogênicas encontram-se *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. malmoens*, *M. simiae* e *M. kansasii* (essas espécies são mais freqüentemente isoladas em pacientes com AIDS, sendo *M. avium* a espécie predominante) e as não patogênicas. Excetuando-se as espécies patogênicas, as demais podem ser encontradas na água, na superfície de vegetais e em animais sadios.

O *M. tuberculosis* é um bacilo sem flagelos, que não forma esporos e não produz toxinas. É uma espécie aeróbica estrita, cujo reservatório é o ser humano,

necessitando de oxigênio para crescer e se multiplicar. Por ser capaz de sobreviver no interior de células fagocitárias, é considerado um parasito intracelular facultativo. É uma micobactéria álcool-ácido resistente de crescimento lento, com tempo de geração de 15 a 20 horas.

### **1.3 A Transmissão e os Mecanismos de Resposta Imunológica**

A tuberculose é normalmente adquirida por inalação do bacilo que se localiza no pulmão podendo disseminar-se para outros órgãos. O bacilo é expelido por pacientes com tuberculose pulmonar ativa (fonte de infecção). Devido a isso, o estreito contato com pessoas doentes em ambientes muito fechados podem provocar a disseminação da doença (STEAD & DUTT, 1989).

As formas mais freqüentes de contágio são a fala, o espirro e, principalmente, a tosse de um doente de TB pulmonar. São lançados no ar gotículas contaminadas de tamanhos variados (1 a 5  $\mu\text{m}$ ). As gotículas mais pesadas se depositam rapidamente e as mais leves permanecem em suspensão no ar. Somente os núcleos secos das gotículas (núcleos de Wells) com 1 a 2 bacilos em suspensão podem atingir os bronquíolos e alvéolos onde são fagocitados pelos macrófagos alveolares e aí iniciar a multiplicação (BRASIL, 1992; BLOOM, 1994).

O risco de infecção pelo bacilo é elevado, mas em pessoas saudáveis não ocorre a manifestação de sintomas por essa infecção. Estima-se que em torno de 5 a 10% das pessoas infectadas desenvolvem a doença dentro de um período de 2 anos (ELLNER, 1986; BLOOM, 1994). Nos demais casos o bacilo fica em estado de dormência podendo reativar tardiamente. A evolução para a doença, depende de múltiplos fatores relacionados com o microorganismo (virulência) e com o hospedeiro (imunidade, fatores genéticos, existência de outras doenças). Essa evolução depende também se o indivíduo está sendo infectado pela primeira vez (primo-infecção ou infecção primária) ou sendo reinfestado (reinfecção exógena). Os bacilos que ficaram em estado de latência poderão também vir a desenvolver TB ativa mesmo muitos anos depois (reativação endógena).

Os mecanismos de resposta imunológica que protegem o indivíduo contra a tuberculose são extremamente complexos e ainda não bem entendidos. No entanto,

tem sido demonstrado que a imunidade na TB é basicamente mediada pelo sistema imunológico celular, principalmente fagócitos mononucleares (macrófagos alveolares, monócitos, células de Küpfer, histiócitos) e linfócitos T.

Na infecção primária, os bacilos alcançam a porção inferior do lobo superior, lobo médio e ápice do lobo inferior do trato respiratório, por serem áreas de maior ventilação, provocando uma inflamação tecidual proveniente da resposta imune celular levando a uma lesão inicial. Quando ocorre a entrada do microorganismo no hospedeiro, não se verifica uma resposta imunológica imediata permitindo sua proliferação sem impedimentos. A resposta imunológica só se desenvolve mais tarde. O *M. tuberculosis* é usualmente fagocitado por macrófagos, que o digerem liberando antígenos bacterianos. Estes estimulam os linfócitos T os quais se multiplicam secretando mediadores que influenciam outros linfócitos T, macrófagos e linfócitos B. Os linfócitos B passam a secretar imunoglobulinas contra esses antígenos, porém sem neutralizá-los (ATLAS, 1995).

Os bacilos que escapam à atividade fagocítica, se reproduzem livremente no interior de macrófagos ocupando todo citoplasma até o seu rompimento. Os lisossomos e as enzimas líticas entram então em contato com os tecidos do hospedeiro. Os bacilos liberados estimulam a ativação de outras células fagocíticas e linfócitos T. As conseqüências desta hipersensibilidade é a formação do granuloma, cáseos e a fibrose, elementos patológicos típicos da lesão tuberculosa. A presença do cáseo persiste por toda a vida.

Micobactérias dormentes podem permanecer viáveis por períodos indefinidos dentro do cáseo e o processo infeccioso pode ser reativado mais tarde, quando fatores fisiológicos podem levar à queda da resposta imunológica, propiciando o início da doença. Em alguns casos a nova infecção fica restrita ao mesmo local da infecção primária, mas em outros pode ocorrer disseminação para tecidos diferentes através da via linfohematogênica e pelo trato gastrointestinal.

Em pacientes que sofrem de AIDS a resposta imunológica para a tuberculose é marcadamente diferente. O vírus HIV, tem um profundo efeito na função das células linfocitárias T, promovendo uma ineficiente resposta imune. Como essa resposta ao *M. tuberculosis* é principalmente celular e não humoral, essa diferença

pode aumentar significativamente o número de casos de tuberculose no futuro (MOULDING, 1989).

Vários estudos tem sido feitos para melhorar o entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica aos antígenos de micobactérias. A ativação e regulação de células T (CD8 e CD4) em presença desses antígenos tem sido investigada (DENIS *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 1996).

#### **1.4 Medidas de Controle de TB**

Esforços para controlar a TB tiveram início por volta de 1900, antes mesmo da existência de tratamentos adequados. As medidas consistiam em cuidados com o paciente, alimentos e roupas e principalmente com as crianças (BATES, 1982).

Desde então, muitas ações têm sido realizadas com a finalidade de controlar e combater a TB, principalmente sob a responsabilidade dos Organismos Públicos encarregados de proteger a Saúde Pública. Os Programas de Controle da TB basicamente desenvolvem estratégias para evitar a morbidade e mortalidade. Essas estratégias consistem em encontrar e tratar os casos de TB ativa, evitar a transmissão na comunidade e prevenir o aparecimento da doença em pessoas identificadas como sendo de alto risco de desenvolver a TB (ETKIND, 1993).

No Brasil, as ações prioritárias desenvolvidas pelo Programa Nacional de Combate a Tuberculose seguem as determinações estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde. Essas ações envolvem o diagnóstico precoce e o tratamento adequado dos doentes que são as fontes de infecção da TB. Além disso, medidas preventivas como a vacinação e quimioprofilaxia têm significativa influência no controle da TB. A vacinação com o bacilo de Calmette e Guérin (BCG), linhagem atenuada de *M. bovis*, embora não evite a TB, protege contra as formas mais graves da doença causada por primo-infecção como TB miliar e meningoencefalite tuberculosa principalmente em crianças (BRASIL, 1992).

Novas estratégias para obtenção de vacinas mais efetivas para TB têm sido estabelecidas por diversos grupos. Vacinas recombinantes, utilizando BCG como vetor e DNA clonado em plasmídeos tem sido descritas com resultados promissores (MURRAY *et al.*, 1996; HUYGEN *et al.*, 1996; TASCAN *et al.*, 1996).

## 1.5 Tratamento

A tuberculose é uma doença grave, porém curável em praticamente 100% dos casos novos, desde que, uma vez diagnosticada a doença, seja empregada a quimioterapia adequada. O tratamento normalmente constitui-se numa associação medicamentosa de uso regular e por tempo suficiente para evitar a resistência e a persistência bacteriana (ATLAS, 1995; BRASIL, 1995).

Atualmente existem vários fármacos conhecidos com ação efetiva sobre o bacilo da TB. Os mais utilizados em diferentes esquemas terapêuticos são a estreptomicina (SM), rifampicina (RMP), etambutol (EMB), pirazinamida (PZA), etionamida (ETH) e isoniazida (INH). Nos Estados Unidos, assim como no Brasil, o esquema terapêutico indicado para casos novos de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar, exceto meningite, são INH, RMP e PZA por 2 meses e mais INH e RMP por 4 meses (BRASIL, 1992). Esta combinação é capaz de impedir a seleção de mutantes resistentes. Numa população bacteriana numerosa haverá, sempre, germes naturalmente resistentes aos diferentes fármacos anti-TB. Esta condição, geneticamente determinada e independente de exposição anterior, é conhecida como resistência natural. Numa população de 1 bilhão de bacilos haverá cerca de 10 mil bacilos naturalmente resistentes. A monoterapia ou a utilização incorreta dos fármacos pode provocar a seleção e a multiplicação de bacilos resistentes (resistência adquirida). Na resistência primária, as linhagens resistentes, quando transmitidas a outras pessoas, serão então resistentes desde o início do tratamento.

O aumento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos (multiresistência) é um dos principais problemas no tratamento e combate a TB em países desenvolvidos (BROOKS *et al.*, 1995). Tais linhagens são prevalentes em determinadas áreas geográficas ou populações (hospitais, prisões) causando importantes surtos (BLOOM & MURRAY, 1992). Isso é ainda mais grave em pacientes com AIDS devido ao fato do risco à infecção estar bastante aumentado. Além disso, enquanto o diagnóstico de TB multiresistente não for realizado para um tratamento adequado, não é interrompida a transmissão (HAAS & PREZ, 1994).

Essas linhagens causam a morte de pacientes imunodeficientes em poucos

meses (KAUFMANN & VAN EMBDEN, 1993). Em Nova York, 40% de todos os isolados são resistentes a um ou mais fármacos, e em alguns casos resistentes a 9 ou 11 dos tuberculostáticos disponíveis para o tratamento.

## **1.6 Métodos de Diagnóstico da TB**

Os métodos de diagnóstico de TB mais utilizados consistem na pesquisa bacteriológica do bacilo (baciloscopia e cultura), na avaliação da resposta celular do indivíduo (prova tuberculínica) ou na avaliação radiológica do órgão comprometido. No Brasil, os procedimentos adotados são atualmente padronizados em todo o território nacional (BRASIL, 1992).

### **1.6.1 Métodos bacteriológicos**

A pesquisa bacteriológica seja pela baciloscopia, ou pela cultura do microorganismo é sem dúvida o método confirmatório mais importante disponível até o momento e permanece como a única forma segura de diagnosticar TB. A metodologia utilizada ainda é a tradicional desenvolvida a anos atrás (KONEMAN *et al.*, 1992).

#### **1.6.1.1 Baciloscopia**

A baciloscopia consiste na visualização microscópica do bacilo da TB após fixação em lâmina e coloração específica do material a ser analisado. É o exame básico para o diagnóstico bacteriológico da tuberculose, principalmente nas formas pulmonares.

Os procedimentos para a preparação do material são bem estabelecidos (BRASIL, 1994). Os métodos de coloração específicos para micobactérias são o Ziehl-Neelsen (ZN) e a coloração fluorescente. O método de ZN é o mais utilizado e está baseado na capacidade das micobactérias em reter a fucsina após coloração e não descolorar com álcool-ácido. Com essa coloração as micobactérias apresentam-se como bastonetes, ligeiramente delgados, corados em vermelho com fundo azul e portanto referidas como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

O método de coloração fluorescente é um procedimento similar ao anterior que consiste em corar as micobactérias pelo fluorocromo, utilizando auramina-rodamina. As bactérias uma vez coradas não se descoram pela adição de álcool-ácido (BLOOM, 1994).

A metodologia é simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo. No entanto, não é específica, uma vez que não é possível distinguir entre as mais de 60 espécies de micobactérias descritas, necessitando tipagem posterior (BROOKS *et al.*, 1995). A sensibilidade do método depende da presença de mais de 5000 organismos por ml de amostra para um resultado positivo (ROUILLON *et al.*, 1976). Isto significa que um esfregaço negativo não exclui um caso de tuberculose. STYBLO & ROUILLON (1981) constataram que metade dos casos de tuberculose pulmonar eram negativos quando examinados pela baciloscopia. Esse fato é ainda mais notável quando a infecção ocorre em outros órgãos (pleura, meninges), onde um número ainda menor de organismos pode causar manifestações clínicas.

#### 1.6.1.2 Cultura de *M. tuberculosis*

O isolamento de micobactérias em meio de cultura é um método mais sensível que a baciloscopia tanto para TB pulmonares como para TB extrapulmonares. A cultura pode detectar de 10 a 100 bacilos por ml de material (HOBBY *et al.*, 1973). Um diagnóstico precoce pode ser realizado pela cultura, mesmo nos casos em que o número de bacilos é insuficiente para uma baciloscopia positiva.

Os meios de cultura mais empregados para o isolamento são os constituídos com ovos como o Löwenstein-Jensen (LJ), que é o mais utilizado e os com ágar, como Middlebrook (7H-10 e 7H-11). Os meios líquidos como 7H-9 são mais adequados para repiques de cultivos e estocagem. O crescimento só é possível de ser detectado 3 a 8 semanas após a inoculação. O teste de sensibilidade aos diferentes fármacos utilizados no tratamento da TB é realizado a partir do isolamento primário (BRASIL, 1994).

Quando os espécimes utilizados para o cultivo forem contaminados como escarro, urina e secreção de cavidade aberta, é necessário eliminar a flora associada,

que contamina o meio e impede a multiplicação dos bacilos. O método de descontaminação mais utilizado é o tratamento com hidróxido de sódio 4%.

A sensibilidade da cultura varia consideravelmente (30 a 96%) com o material analisado, porém é altamente específica independente do material (LEVY *et al.*, 1989; LIBRE *et al.*, 1992; BLOOM, 1994). A diferenciação de *M. tuberculosis* de outras micobactérias (micobactérias atípicas), é importante, desde que mais de 25 espécies de micobactérias podem ser encontradas em espécimes humanos. No entanto, *M. tuberculosis* é a espécie comumente isolada, sendo muito raro o isolamento de outras espécies do complexo *M. tuberculosis*. *M. bovis* BCG é, algumas vezes, isolada como resultado de reativação de infecção de pacientes vacinados com BCG. A identificação da espécie de micobactéria isolada na cultura deve ser realizada pela análise do aspecto morfológico de colônia, velocidade de crescimento e através de testes bioquímicos (BRASIL, 1992). Para a realização desses testes são requeridas 2 ou mais semanas.

#### 1.6.2 Método radiométrico (Sistema BACTEC )

O método radiométrico BACTEC TB 460 consiste em um sistema semi-automatizado (Becton Dickinson Instruments System) baseado na detecção de  $^{14}\text{CO}_2$  liberado pelas micobactérias pela utilização do ácido palmítico marcado com  $^{14}\text{C}$  presente no meio de cultura. A detecção de micobactérias por esse sistema é mais rápido, levando de 7 a 15 dias dependendo do número de bactérias na amostra analisada. A sensibilidade e especificidade do método são semelhantes àquela obtida pela cultura convencional (ELLNER *et al.*, 1989; ABE *et al.*, 1992; BLOOM, 1994). Esse sistema também pode ser empregado para a realização do teste de sensibilidade aos fármacos utilizados no tratamento e para a diferenciação de *M. tuberculosis* de outras micobactérias. O resultado final, incluindo isolamento e teste de sensibilidade pode ser obtido em 20 dias, enquanto que pelo método convencional são necessários no mínimo 40 dias. No entanto, para a utilização do sistema BACTEC é preciso um equipamento de custo elevado e compostos radioativos, o que restringe a utilização a poucos laboratórios no país.

### 1.6.3 Prova Tuberculínica

A prova tuberculínica (teste de Mantoux) é usada como método auxiliar de diagnóstico da TB. Esse teste é baseado na reação celular desenvolvida pelo indivíduo exposto ao bacilo da tuberculose, mediante a inoculação intradérmica de um derivado protéico de *M. tuberculosis* (tuberculina). A tuberculina é preparada a partir de culturas de *M. tuberculosis*. A técnica de purificação do produto foi proposta por Seibert, que obteve um produto denominado derivado proteico purificado (PPD) (EDWARDS & EDWARDS, 1960). A tuberculina atualmente usada é o PPD RT23, preconizada pela OMS e aplicada por via intradérmica.

A prova tuberculínica positiva, isoladamente, evidencia apenas infecção com *M. tuberculosis* e não basta como diagnóstico de TB, pois não necessariamente implica em doença (SBARBARO, 1986). Em pessoas sintomáticas, o teste pode contribuir de forma importante. Entretanto, mais de 25% das pessoas imunocompetentes com diagnóstico de TB demonstram resultado negativo no teste (NASH & DOUGLAS, 1980). Entre pacientes com tuberculose e AIDS, a frequência de positividade da tuberculina varia conforme o grau de comprometimento do sistema imune (REIDER *et al.*, 1989). A vacina BCG induz reação à prova tuberculínica tanto quanto a infecção natural. Por essa razão, torna-se difícil a interpretação do teste em pessoas vacinadas com BCG, que poderão desenvolver reações fortes ao PPD (BRASIL, 1995). Com frequência, indivíduos gravemente doentes apresentam um Mantoux negativo, o mesmo acontecendo com idosos e pacientes aidéticos.

### 1.6.4 Métodos radiológicos

O método radiológico, principalmente a radiografia do torax é outro exame complementar bastante utilizado. Apesar de sua especificidade ser bastante baixa, em países desenvolvidos, usualmente este é o primeiro método de diagnóstico a ser utilizado após o exame físico. A TB pulmonar quase sempre causa anomalias que podem ser visualizadas em imagens radiográficas. Porém, as alterações encontradas nem sempre são devidas à TB. Com a freqüente associação com o vírus HIV, a radiografia do torax passa a ter um importante papel na diferenciação de formas de

TB de apresentação atípica e no diagnóstico de outras pneumopatias (BRASIL, 1992; BLOOM, 1994; BRASIL, 1995).

#### 1.6.5 Imunodiagnóstico de TB

Tem-se buscado extensamente estabelecer métodos alternativos para o diagnóstico de TB com o objetivo de obter maior sensibilidade e rapidez na detecção da doença. Basicamente, os novos métodos buscam detectar respostas específicas do hospedeiro à micobactéria como as imunoglobulinas (métodos sorológicos) presentes na resposta humoral, ou visam à detecção de produtos e componentes micobacterianos, como proteínas e ácidos nucleicos.

A identificação sorológica de TB foi relatada pela primeira vez por ARLOING em 1898 (DANIEL & DEBANNE, 1987). Desde então várias técnicas têm sido propostas para o sorodiagnóstico como hemoaglutinação, aglutinação em látex, imunofluorescência indireta e radioimunoensaio. No entanto, apesar dos promissores resultados iniciais, nenhuma dessas técnicas demonstrou índices de especificidade e sensibilidade satisfatórios para estimular o uso no diagnóstico de TB. A detecção de anticorpos que reconheciam antígenos derivados do *M. tuberculosis* foi demonstrado não apenas em soros de pessoas com TB mas também em um número significativo de soros controles (BARDANA *et al.*, 1973).

Em 1972, ENGVALL e PERLMANN descreveram um método imunoenzimático altamente sensível e reprodutível denominado "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA). Várias tentativas vem sendo realizadas para adaptar essa técnica ao diagnóstico de TB, devido aos excelentes resultados encontrados com outras doenças infecciosas e ainda, pela sua aplicabilidade em soro. A utilização de soro, para detectar anticorpos IgG, sempre despertou muito interesse, como alternativa no diagnóstico de TB. Este, sem dúvida, seria de mais fácil obtenção e quantidades muito pequenas já seriam suficientes. Em crianças com TB pulmonar, como a obtenção de escarro é difícil, a análise é normalmente realizada em lavado gástrico. Em casos de tuberculose extrapulmonar é ainda mais difícil utilizar técnicas de detecção em espécimes clínicos (DANIEL & DEBANNE, 1987).

Conforme ficou demonstrado, a especificidade e sensibilidade do método de ELISA dependiam do antígeno utilizado. Vários esforços foram feitos para a identificação de antígenos específicos de *M. tuberculosis* com maior capacidade imunogênica que possibilitassem o adequado diagnóstico sorológico da doença. Os testes iniciais foram realizados com antígenos purificados de culturas de *M. tuberculosis*, sonicados de BCG e PPD (DANIEL *et al.*, 1985; KRAMBOVITIS, 1985; RANADIVE *et al.*, 1986). Anticorpos monoclonais derivados de diferentes antígenos de *M. tuberculosis* como as proteínas de 38, 19, 16 e 14 KDa e antígenos de superfície foram caracterizados e usados em ELISA de competição e Western blot (HEWITT *et al.*, 1982; JACKETT *et al.*, 1988; WALLIS *et al.*, 1989; WILKINS & IVANYIL, 1990; GLATMAN-FREEDMAN *et al.*, 1996). Os resultados dos testes demonstraram respostas significativamente diferentes para cada antígeno e associadas a cada estágio e forma clínica da doença. Anticorpos contra o antígeno de 38 KDa estavam elevados em pacientes com TB pulmonar multibacilar. Em TB meníngea, somente os anticorpos contra 16 KDa se encontravam aumentados. Porém, os níveis desses anticorpos também estavam alterados em pessoas cronicamente doentes (JACKETT *et al.*, 1988). A utilização do antígeno de 19 KDa resultava em reações cruzadas com *M. avium*. WILKINSON *et al.* (1997) expressaram o gene que codifica o antígeno de 38 KDa em *Escherichia coli* e avaliaram o produto recombinante em ensaios realizados com células T e produção de anticorpo. A sensibilidade do teste em comparação com a cultura foi de 72% e a especificidade de 94,9%.

Apesar dos diversos testes sorológicos propostos, uma técnica sorológica específica e suficientemente sensível ainda não foi estabelecida, provavelmente uma combinação de vários antígenos pode ser necessária para compensar as diversas variações existentes nas respostas imunológicas do hospedeiro aos antígenos até agora conhecidos presentes no *M. tuberculosis*. Muitas vezes as respostas são fracas ou dirigidas predominantemente contra vários antígenos das micobactérias. PATIL *et al.* (1996) identificaram por "Western blotting" reatividade de anticorpos (análise de líquido) com várias regiões antigênicas (30 a 40, 14 e 18-25kDa). Respostas dirigidas à micobactérias inespecíficas tornam ainda mais difícil diferenciar entre pessoas saudáveis e doentes (BARDANA *et al.*, 1973). Ocorre ainda que no Brasil a grande

maioria das pessoas é vacinada, possuindo anticorpos que reconhecem antígenos de superfície de *M. bovis* BCG que são comuns a *M. tuberculosis*.

#### 1.6.6 Métodos de detecção de ácidos nucleicos

O genoma da maioria dos microorganismos contém seqüências de bases nos ácidos nucleicos que são específicas para gênero, espécie e linhagem. Fragmentos de ácido nucleicos contendo essas seqüências altamente específicas podem ser usadas para hibridizar com seqüências complementares de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). O conhecimento cada vez mais maior de regiões genômicas de *M. tuberculosis* associado ao avanço das técnicas de biologia molecular tem permitido o desenvolvimento de metodologias para detecção de TB através do DNA de *M. tuberculosis*.

##### 1.6.6.1 Sondas de ácidos nucleicos

Os métodos de diagnóstico com sonda são baseados na capacidade das moléculas de ácidos nucleicos de formarem estruturas fita dupla estáveis através do pareamento de bases (hibridização). As sondas de ácidos nucleicos normalmente são compostas de poucos nucleotídeos (oligonucleotídeos) complementares à seqüência específica pesquisada, como por exemplo uma região genômica do *M. tuberculosis*. A sonda deve estar marcada com um componente capaz de permitir a detecção da hibridização.

As primeiras sondas desenvolvidas para a pesquisa de *Mycobacterium sp* eram marcadas com compostos radioativos como  $^{125}\text{I}$  (Gen-Probe, San Diego, CA),  $^3\text{H}$  e  $^{35}\text{S}$ . Esses métodos apesar de serem bastantes sensíveis eram difíceis de serem adaptados à rotina pelos problemas inerentes ao uso de radioatividade (HUEBNER *et al.*, 1993). Por essa razão, os métodos de marcação não radioativos, que utilizavam enzimas ligadas à sondas foram desenvolvidos e introduzidos no mercado para uso clínico.

Apesar da precisão do diagnóstico obtido por sondas em meios de cultura, os dados de sensibilidade e especificidade são inferiores a 90% (PAO *et al.*, 1988; DANIEL, 1989) e esses métodos apresentam limitações em amostras clínicas, pois

pequenas quantidades de bacilo não são detectadas (AOKI & YAMADA, 1994). A identificação de micobactérias por sondas em amostra clínicas ainda está sendo testada.

#### 1.6.6.2 Diagnóstico de TB por PCR

A mais promissora técnica para a rápida detecção do *M. tuberculosis* é baseada no método conhecido como “polymerase chain reaction” (PCR). Esse método de amplificação de ácidos nucleicos foi inventado por Kary Mullis. Foi utilizada pela primeira vez por SAIKI *et al.* (1985). Esse método é constituído de ciclos repetidos de síntese de segmentos de DNA, orientada por oligonucleotídeos (“primer”), para promover uma replicação “in vitro” da seqüência de DNA alvo. A seqüência dos oligonucleotídeos é determinada pelo segmento de ácido nucleico alvo e deve ser complementar às regiões que flanqueiam ambas as fitas da molécula de DNA a ser amplificada (sítios de anelamento). O produto de amplificação conterà fitas opostas de DNA de comprimentos indeterminados. Entretanto, depois do segundo ciclo um produto de amplificação específico, com tamanho determinado, começa a se acumular e tornar-se o produto de amplificação predominante. O produto da reação de PCR será identificado pelo tamanho e seqüência de nucleotídeos. Desde então, muitos métodos para amplificação de ácido nucleicos têm sido propostos. Uma vez que o diagnóstico de TB depende de um número suficiente de bacilos ou de produtos em quantidades mínimas para serem identificados, o emprego da técnica de PCR tem mostrado resultados promissores. Ela permite a obtenção de seqüências nucleotídicas específicas de *M. tuberculosis* em poucas horas. A descrição de vários ensaios baseados em PCR para a detecção e identificação de espécies de *Mycobacterium*, tais como *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. leprae*, tem sido publicados (BRISSON-NOEL *et al.*, 1989; BÖDDINGHAUS *et al.*, 1990; EISENACH *et al.*, 1990; FRIES *et al.*, 1991; SJÖBRING *et al.*, 1990; DEL PORTILLO *et al.*, 1991; ALTAMIRANO *et al.*, 1992; COUSINS *et al.*, 1992).

### 1.6.6.2.1 “Primers” mais utilizados

A especificidade do processo vai depender dos “primers” escolhidos. Muitas seqüências nucleotídicas tem sido utilizadas como alvo para o diagnóstico de TB e especificidades acima de 98% tem sido relatadas com todas as seqüências. Regiões de genes que são conservados e com cópia única no genoma de micobactérias como o gene que codifica uma proteína de 65 KDa, têm sido amplificadas (BRISSON-NOEL *et al.*, 1989; PAO *et al.*, 1990). Esse gene que codifica um antígeno bacteriano está presente no genoma de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. paratuberculosis* e *M. fortuitum*. “Primers” construídos com base na seqüência deste gene permite a detecção dessas micobactérias pela amplificação de uma região do gene de 65 KDa comum a todas as espécies e a identificação por hibridização com uma sonda de região específica da espécie (HANCE *et al.*, 1989; PIERRE *et al.*, 1991).

Vários ensaios de PCR são realizados com oligonucleotídeos construídos para amplificar regiões de genes específicos do complexo *M. tuberculosis* que codifica antígenos como o de 38 KDa (ANDERSEN & HANSEN, 1989; SJÖBRING *et al.*, 1990; MIYAZAKI *et al.*, 1993), o antígeno MPB70 (COUSINS *et al.*, 1992), o MPB64 de *M. bovis* (MANJUNATH *et al.*, 1991; SHANKAR *et al.*, 1991; CORMICAN *et al.*, 1992) e o antígeno de 32 KDa (SOINI *et al.*, 1996). HERRERA & SEGOVIA (1996) utilizaram “primers” correspondentes ao gene *mtp40* para detecção de *M. tuberculosis*. Este gene é específico da espécie o que pode levar a uma diferenciação dos demais membros do complexo. No entanto, a ausência deste gene em isolados de *M. tuberculosis* já foi descrita, o que restringe a sua utilização (WEIL *et al.*, 1996).

Muitos dos ensaios de PCR usam como região alvo uma seqüência de inserção de DNA (IS) repetitiva e específica do complexo *M. tuberculosis*. Esta seqüência de inserção denominada IS6110 está repetida de 1 a 20 vezes no cromossomo bacteriano o que poderia explicar uma maior sensibilidade dos métodos que utilizam essa região para a amplificação (EISENACH *et al.*, 1990; THIERRY *et al.*, 1990; HERMANS *et al.*, 1990b; ZAMBARDI *et al.*, 1993; FORBES & HICKS, 1993; CHO *et al.*, 1995; AMICOSANTE *et al.*, 1995).

Fragmentos de DNA que codificam uma região do gene do RNA ribossomal 16S (rRNA), também têm sido alvo de ampliações por PCR (DEL VECHIO *et al.*, 1994). Existe atualmente no mercado um teste comercial denominado “Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay” (Roche Molecular Systems) que utiliza a amplificação de uma região do gene do rRNA 16S (BERGMANN & WOODS, 1996; BENNEDSEN *et al.*, 1996). BEENHOUWER *et al.* (1995) desenvolveram um sistema de detecção e identificação de doenças causadas por bactérias baseado na amplificação seletiva por PCR de micobactérias com “primers” correspondentes a regiões dos genes que codificam para rRNA 16S. Uma variedade de micobactérias foi amplificada com os oligonucleotídeos específicos do gênero *Mycobacterium*. A identificação da espécie foi realizada com sondas de seqüências complementares específicas.

O “Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test” (AMTD), da empresa Gen-Probe, foi o primeiro sistema baseado na amplificação de rRNA para uso em laboratório clínico. O ensaio da Gen-Probe detecta rRNA que está presente em níveis de aproximadamente 2.000 cópias por célula. O diagnóstico de TB por PCR utilizando rRNA para amplificação tem sido proposto para aumentar a sensibilidade do teste em relação aos que utilizam gene cópia única ou com número baixo de cópias como alvo da amplificação (JONAS *et al.*, 1993; PFYFFER *et al.*, 1994; BODMER *et al.*, 1994; SHAH *et al.*, 1995; EHLERS *et al.*, 1996). O RNA para ser amplificado é primeiramente convertido em uma molécula de DNA complementar (cDNA) por uma enzima com atividade de transcriptase reversa. A sensibilidade deste sistema demonstrou ser similar a sensibilidade encontrada com a amplificação utilizando a seqüência IS6110 como região alvo. A detecção limite para os dois testes era menos de 10 células por reação (ABE *et al.*, 1993). Resultados positivos de métodos baseados na amplificação de rRNA podem estar fortemente correlacionados com a presença do organismo vivo. O RNA sendo mais lábil que o DNA dificilmente permanecerá intacto após a morte celular permitindo um monitoramento do tratamento (SHAH *et al.*, 1995; MOORE *et al.*, 1996).

Alguns protocolos de amplificação foram elaborados para reamplificar os fragmentos de PCR obtidos em uma reação com “primers” diferentes elaborados para

hibridizar em uma região interna à seqüência gênica já amplificada. Este procedimento foi denominado de “PCR nested” e amostras clínicas negativas no PCR em protocolo convencional tornaram-se positivas após a reamplificação (PIERRE *et al.*, 1991; MIYAZAKI *et al.*, 1993).

#### **1.6.6.2.2 Métodos de preparação de amostra**

Outro fator muito importante para a eficiência na aplicação da técnica de PCR é o método utilizado para preparação da amostra clínica para a amplificação. Isso inclui a forma de extração do DNA (lise celular e purificação). Uma comparação dos resultados de PCR obtidos da análise de escarros, saliva e água com um número estabelecido de micobactérias, foi realizada em 7 laboratórios diferentes. Os níveis de sensibilidade variaram de 2 a 90% para as amostras com  $10^3$  micobactérias. A possível causa dessa diferença, foi a variação nos protocolos. Apesar de todos os laboratórios utilizarem o elemento de inserção IS6110 como região alvo, cada um tinha seu próprio protocolo de preparação da amostra, amplificação e detecção do produto amplificado (NOORDHOEK *et al.*, 1994).

Vários métodos de preparação de amostra têm sido publicados. A primeira etapa desta preparação consiste em romper a célula bacteriana para ocorrer a liberação do DNA. Em micobactérias esse processo é um pouco mais difícil uma vez que a parede do bacilo possui características peculiares como alto conteúdo lipídico. Foram descritas lise celular com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (THIERRY *et al.*, 1990), Tween 20 (BRISSON-NOEL *et al.*, 1991; ANDERSEN *et al.*, 1992; FOLGUEIRA *et al.*, 1993), Triton X-100 (SHAWAR *et al.*, 1993), Nonidet P40 (ZAMBARDI *et al.*, 1993; QUEROL *et al.*, 1995), Tiocianato de guanidina (BOOM *et al.*, 1990; ABE *et al.*, 1993; WILSON *et al.*, 1993a). Em alguns protocolos além dos tampões de lise com alguma dessas substâncias, as amostras ainda eram incubadas a temperaturas elevadas (75-100°C) a fim submeter as células a uma lise térmica (SHAWAR *et al.*, 1993; NOLTE *et al.*, 1993). Vários protocolos incluíam apenas temperaturas elevadas para lise celular (SAVIC *et al.*, 1992; VERINGA *et al.*, 1992; VICTOR *et al.*, 1992; FORBES & HICKS, 1993; KOCAGÖZ *et al.*, 1993). A alternância de temperaturas extremas como congelamento rápido em nitrogênio

líquido com posterior fervura também foi usada (TREWICK & DAERDEN, 1994). O rompimento da parede celular por processos mecânicos também pode ser obtida com partículas de vidro (SANTOS *et al.*, 1992) ou partículas de zircônio (KOX *et al.*, 1994). A lise bacteriana por tratamento com ultra som também foi descrita (SAVIC *et al.*, 1992; FOLGUEIRA *et al.*, 1993; NOLTE *et al.*, 1993).

A segunda etapa na preparação da amostra consiste em purificar o DNA, que possivelmente esteja presente, removendo substâncias encontradas normalmente em materiais clínicos que podem atuar como inibidores da *Taq* DNA polimerase no processo de amplificação. Os métodos descritos na literatura variam desde utilizar o DNA sem qualquer tratamento de purificação (MERCIER *et al.*, 1990; KOGACÖZ *et al.*, 1993; SHAWAR *et al.*, 1993), até adicionar substâncias capazes de purificar o DNA como fenol/clorofórmio ou clorofórmio/álcool isoamílico e posteriormente concentrá-lo com diferentes álcoois (BRISSON-NOEL *et al.*, 1989; ROGERS *et al.*, 1990; HERMANS *et al.*, 1990a; SHANKAR *et al.*, 1991; MANJUNATH *et al.*, 1991; PIERRE *et al.*, 1991; ALTAMIRANO *et al.*, 1992; COUSINS *et al.*, 1992; NOLTE *et al.*, 1993; MIYAZAKI *et al.*, 1993). Partículas de sílica (ANDERSEN *et al.*, 1993; WILSON *et al.*, 1993a; ABE *et al.*, 1993) e sacarose (VICTOR *et al.*, 1992) também foram utilizadas no processo de purificação. AMICOSANTE *et al.* (1995) descreveram o uso de uma resina ligadora de ânions GeneReleaser (GR) para purificar o DNA, capaz de melhorar a sensibilidade de 77% quando extraídas com fenol-clorofórmio para 91% usando a GR para a extração.

#### **1.6.6.2.3 Detecção dos fragmentos amplificados por PCR**

A detecção do produto amplificado é outra etapa importante do processo. A metodologia utilizada para tal tem considerável influência na sensibilidade da técnica de PCR. Os protocolos de amplificação têm buscado visualizar os fragmentos de DNA amplificados na reação diretamente em géis de agarose corados com brometo de etídio (COUSINS *et al.*, 1992; KOCAGÖZ *et al.*, 1993; QUEROL *et al.*, 1995; CONDOS *et al.*, 1996) e poliacrilamida (VICTOR *et al.*, 1992) ou através da hibridização dos fragmentos amplificados com sondas específicas. A detecção da hibridização tem sido feita pelo uso de marcadores. Os marcadores radioativos como,

por exemplo, o  $^{32}\text{P}$ , foram bastante utilizados. A radiação era detectada em filmes radiográficos (MANJUNATH *et al.*, 1991; SHANKAR *et al.*, 1991; CORMICAN *et al.*, 1992). Substâncias que podem ser incorporadas a moléculas de DNA como biotina (NOLTE *et al.*, 1993; ANDERSEN *et al.*, 1993) e digoxigenina (WILSON *et al.*, 1993a; VERINGA *et al.*, 1992) estão agora substituindo os marcadores radioativos, devido a um manuseio mais fácil e acessível. A hibridização com esses marcadores poderá ser então detectada com estreptoavidina e anticorpos anti-digoxigenina ligados a uma enzima (normalmente fosfatase alcalina ou peroxidase). A reação com o substrato da respectiva enzima, produzirá luminescência detectável em filmes de raio X (ABE *et al.*, 1993; NOLTE *et al.*, 1993; MIYAZAKI *et al.*, 1993) ou produzirá uma coloração que poderá ser medida quantitativamente em espectrofotômetros.

As etapas de hibridização podem ser realizadas com membranas de náilon em experimentos de "Southern blotting" (VERINGA *et al.*, 1992; WILSON *et al.*, 1993b; ANDERSEN *et al.*, 1993), microplacas (WILSON *et al.*, 1993a; CHO *et al.*, 1995; BERGMANN & WOODS, 1996). BEENHOUWER *et al.* (1995) desenvolveram um método para detecção de amplicons (produto amplificado) por hibridização em microplacas. Os amplicons são marcados com digoxigenina-11-dUTP durante o PCR. Posteriormente os amplicons são hibridizados com oligonucleotídeos biotinizados em microplacas revestidas com estreptoavidina. A detecção da hibridização foi feita por um método imunoenzimático clássico. O teste da Gen-Probe (AMTD) utiliza microplacas para desenvolver todas as etapas do processo.

#### **1.6.6.2.4 Amplificação de DNA de amostras clínicas**

A forma mais freqüente de tuberculose é a pulmonar, sendo o escarro o espécime clínico mais adequado para a pesquisa do bacilo da TB. O escarro pode ser utilizado em todos os procedimentos de diagnóstico laboratorial inclusive para PCR. Vários dos trabalhos publicados com o objetivo de testar a eficácia da técnica de PCR, utilizaram escarro como amostra a ser analisada. Este fato deve-se principalmente, a possibilidade de comparação dos resultados com os métodos tradicionais de baciloscopia e cultura (PIERRE *et al.*, 1991; CORMICAN *et al.*,

1992; ABE *et al.*, 1993; JONAS *et al.*, 1993; TREWICK & DEARDEN, 1994; AMICOSANTE *et al.*, 1995; SHAH *et al.*, 1995; CHO *et al.*, 1995; HERRERA & SEGOVIA, 1996).

O método de amplificação de ácidos nucléicos tem despertado o maior interesse dos pesquisadores para aplicação justamente em amostras clínicas que não apresentam sensibilidade suficiente nos testes tradicionais, por apresentarem escassa quantidade de bacilos presentes (materiais paucibacilares). Muitos tipos de amostras paucibacilares diferentes tem sido analisadas por PCR como líquido pleural, líquido, lavado gástrico, urina, lavado bronquioalveolar (LBA), secreção purulenta e material de biópsia. Os resultados encontrados têm demonstrado uma sensibilidade maior nas análises por PCR quando comparadas com os métodos até então disponíveis (COUSINS *et al.*, 1992; MIYAZAKI *et al.*, 1993; ZAMBARDI *et al.*, 1993; FOLGUEIRA *et al.*, 1993; PFYFFER *et al.*, 1994; BODMER *et al.*, 1994; BEENHOUWER *et al.*, 1995; BERGMANN & WOODS, 1996).

A análise do escarro para o diagnóstico da TB nem sempre é satisfatório, pois existem casos onde a coleta de escarro é difícil, principalmente em crianças. Nos casos de TB extrapulmonares também existem dificuldades de obtenção de amostra e os procedimentos de coleta podem acarretar um certo risco para o paciente (biópsias). Assim, a investigação de *M. tuberculosis* em sangue tem despertado interesse. Alguns trabalhos já demonstraram o potencial diagnóstico desse tipo de amostra ao amplificar DNA de *M. tuberculosis* em sangue de pacientes com TB (BRISSON-NOEL *et al.*, 1989; KOX *et al.*, 1994). Pacientes com tuberculose pulmonar apresentaram evidências de DNA de *M. tuberculosis* na fração linfocitária do sangue periférico. Nenhum sangue de pessoas normais testado como controles foi positivo no PCR (SCHLUGER *et al.*, 1994a; CONDOS *et al.*, 1996).

As amostras de escarro e líquidos de cavidades abertas normalmente testadas por PCR também são testadas por cultura. Assim, o procedimento de descontaminação do material de outras espécies de microorganismos devem ser realizados por tratamento com NaOH 4% ou N-acetil-L-cisteína/NaOH (KUBICA & KENT, 1985).

#### 1.6.6.2.5 Resultados falso negativo e positivo

Para que a técnica de PCR seja executada com sucesso no diagnóstico de doenças, precauções rigorosas são essenciais e devem ser adotadas a fim de evitar resultados falso-positivos e falso-negativos. São necessários a introdução de controles em todas as etapas do processo para confirmar a obtenção adequada do DNA da amostra clínica, a eficiência da reação de PCR e a ausência de contaminação cruzada com produto de *M. tuberculosis* nos reagentes (BARNES & BARROWS, 1993; NOORDHOEK *et al.*, 1996; BENNEDSEN *et al.*, 1996).

Os resultados falso-negativos podem ser adequadamente evitados pela utilização de técnicas de purificação de DNA eficazes. Alguns autores propõem o uso de controles internos na reação alegando que alguns tipos de amostras (sangue, escarro e líquido pleural) possuem substâncias inibidoras (hemoglobina e heparina) que podem permanecer mesmo após a purificação do DNA. DE WIT *et al.* (1993) utilizaram DNA de *M. kansasii* como medida de controle da reação de amplificação. KOLK *et al.* (1994) descreveram a alteração no genoma de uma linhagem de *M. smegmatis* para utilizar como controle interno de reação de PCR para a detecção de *M. tuberculosis* com “primers” complementares ao IS6110. A modificação foi realizada pela inserção de 56 nucleotídeos da seqüência do elemento IS6110 de *M. bovis* BCG. A bactéria modificada foi adicionada nas amostras clínicas a serem analisadas. Essa adição serviria como um controle de todas as etapas do processo, desde a extração da amostra até a presença de substâncias inibidoras. O resultado final da reação de PCR era a amplificação de um fragmento de 301 pb e um fragmento de 245 pb correspondendo a *M. smegmatis* e a *M. tuberculosis* respectivamente, amplificados pelos mesmo par de “primers”.

Uma modificação na metodologia de amplificação de ácidos nucléicos foi realizada com o objetivo de aumentar a sensibilidade, eliminando a possibilidade de interferência de inibidores presentes na reação. O ensaio é baseado na captura de moléculas de rRNA 23S por uma sonda específica seguida pela amplificação com a enzima Q $\beta$  replicase (SHAH *et al.*, 1995). A detecção de *M. tuberculosis* em escarros com Q $\beta$  replicase foi de 0,5 CFU enquanto que a detecção por PCR de regiões do

elemento IS6110 foi de 5 CFU. Além disso, os ensaios com Q $\beta$  replicase não foram influenciados por inibidores encontrados no escarro (BUXTON *et al.*, 1995).

Os resultados falso-positivos por contaminações são, sem dúvida, o maior problema na rotina de laboratórios que utilizam a metodologia devido à extrema sensibilidade do PCR. Essas contaminações são provenientes não só de amostras positivas mas de produtos novos de PCR (amplicons) aerosolizados. Alguns procedimentos têm sido propostos para controlar o problema, tais como modificar os amplicons com radiação ultravioleta ou fotoquimicamente (CIMINO *et al.*, 1990). A modificação enzimática com uracil DNA glicosilase (UDG) do amplicon também foi descrita (LONGO *et al.*, 1990; KOX *et al.*, 1994). UDG tem a função de remover bases uracil do DNA resultando em sítios apirimidínicos que bloqueiam o processo de replicação pela DNA polimerase. Para tornar o amplicon degradável pela UDG, na reação de PCR, dTTP é substituído por dUTP. A eficiência da reação não foi afetada pela substituição.

O isolamento físico de todas as etapas do processo e autoclavagem dos reagentes também são indispensáveis para evitar os problemas de contaminação (KWOK & HIGUCHI, 1989; NOORDHOEK *et al.*, 1996).

#### 1.6.6.5 Sensibilidade e especificidade da técnica de PCR

Como foi comentado anteriormente, todas as etapas da técnica de PCR são extremamente importantes para garantir a eficácia da metodologia. A sensibilidade da técnica de PCR varia consideravelmente nos diferentes métodos de amplificação de ácidos nucleicos até agora publicados. Para comparar a sensibilidade e especificidade de diferentes procedimentos de amplificação já descritos para a detecção de *M. tuberculosis* em amostras clínicas é necessário considerar o tipo de amostra clínica analisada, método de preparação da amostra, "primers" utilizados e método de detecção dos fragmentos amplificados.

Conforme se pode observar, a sensibilidade depende ainda do padrão-ouro usado para a comparação. Em TB o padrão-ouro é bastante problemático. Para análise de casos de TB pulmonar, cuja amostra a ser analisada é escarro, o padrão-ouro mais utilizado é a cultura. No entanto, para amostras clínicas obtidas de

pacientes com TB extrapulmonares o mais adequado é comparar os resultados obtidos com o diagnóstico clínico do paciente, pela baixa eficiência da cultura na maioria dos casos.

A tabela 1.1 compara alguns métodos de amplificação por PCR que utilizaram os “primers” IS6110 em amostras de espécimes respiratórios com a sensibilidade e especificidade. O limite de detecção considerado é o obtido em cada procedimento de amplificação na detecção de *M. tuberculosis*, com valores em unidades formadoras de colônias (UFC) e a sensibilidade e especificidade em relação aos resultados das amostras clínicas obtidos em cultura (resultado em %).

**TABELA 1.1. Limite de detecção, sensibilidade e especificidade obtidos por diferentes métodos de preparação de amostra e de detecção do produto de PCR**

Preparação da amostra	Forma de detecção	Limite de detecção UFC	Especif. %	Sensibil. %	Referência
tiocianato de guanidina sílica	Southern blotting, sonda/ biotina	100	100	98	ANDERSEN <i>et al.</i> , 1993
tiocianato de guanidina sílica	Southern blotting, sonda/ digoxigenina	0,23	97,2	87,2	ABE <i>et al.</i> , 1993
fervura, SDS, chelex (Biorad)	1. gel de agarose	30		84	ZAMBARDI <i>et al.</i> , 1993
sílica	2. sonda /digoxigenina colorimétrico,	5	87		<i>et al.</i> , 1993
fenol/clorofórmio	“primers”/digoxigenina	1	99	92	WILSON <i>et al.</i> , 1993a
fervura	gel de agarose	10	100	68	KOCAGÖZ <i>et al.</i> , 1993
fervura	sonda/biotina	2	100	91	NOLTE <i>et al.</i> , 1993
fenol/clorofórmio					<i>et al.</i> , 1993
fervura	1. gel de agarose	50	98	66	SHAWAR <i>et al.</i> , 1993
Triton X-100	2. sonda/digoxigenina	5	95	77	<i>et al.</i> , 1993
nonidet	gel de agarose	-	100	97	QUEROL <i>et al.</i> , 1995
proteínaseK					<i>et al.</i> , 1995
fenol/clorofórmio					
-fenol/clorofórmio	colorimétrica	200	95	77	AMICOSANTE <i>et al.</i> , 1995
-fenol/clorofórmio resina	sonda /biotina	20	95	91	<i>et al.</i> , 1995
Partículas de zircônio	colorimétrica	12.5	97	100	CHO <i>et al.</i> , 1995
clorofórmio/isoamil	“primers”/biotina				<i>et al.</i> , 1995

## 1.7 Epidemiologia Molecular da TB

Além da obtenção de um diagnóstico rápido e seguro para tuberculose, a caracterização de linhagens de *M. tuberculosis* isoladas nas amostras clínicas é importante, pois pode fornecer dados para o entendimento de aspectos epidemiológicos como virulência e resistência aos fármacos. A adequada distinção entre linhagens em situações de surtos pode prover informações úteis para a tomada de decisões no combate a doença. A detecção rápida da linhagem que está causando TB, principalmente em casos de *M. tuberculosis* resistentes, pode colaborar para localizar a fonte de transmissão, possibilitando a interrupção rápida da transmissão.

Estudos sobre a epidemiologia da TB têm sido dificultados pela falta de métodos capazes de diferenciar isolados de *M. tuberculosis*. As espécies do complexo *M. tuberculosis* pertencem a um grupo de bactérias muito homogêneo, difícil de serem diferenciadas por marcadores bioquímicos e características de crescimento. Técnicas de agrupamento sorológico, fago-tipificação e isoenzimas têm permitido a detecção de diferenças no fenótipo, possibilitando uma distinção interespecie. A fago-tipificação tem sido usada para diferenciar linhagens pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (GRUFT *et al.*, 1984), porém seu uso é limitado por dificuldades técnicas e pelo baixo número de linhagens suscetíveis aos fagos (CRAWFORD & BATES, 1982).

A grande correlação taxonômica existente entre as espécies do complexo *M. tuberculosis* também é refletida em estudos genômicos por hibridização de DNA e clivagens com endonucleases de restrição. As hibridizações demonstraram 100% de homologia entre as espécies (CLARK-CURTISS, 1990). Os padrões de bandas gerados pelos fragmentos de DNA obtidos após a clivagem do DNA das diferentes espécies e mesmo de um grupo de linhagens de uma mesma espécie eram praticamente idênticos. No entanto, diferenças mínimas permitiam distinguir algumas subespécies de *M. tuberculosis* e a espécie *M. bovis* (COLLINS & LISLE, 1984). Um maior polimorfismo podia ser observado quando os fragmentos clivados eram separados e hibridizados com seqüências específicas de DNA correspondendo a regiões repetitivas do DNA de *M. tuberculosis* (EISENACH *et al.*, 1988;

ZAINUDDIN & DALE, 1989). Posteriormente, essas regiões foram caracterizadas e duas classes de DNA demonstraram serem responsáveis pelos padrões de bandas polimórficos observados: (1) Elementos de transposição, da classe das seqüências de inserção (IS). Essas seqüências codificam enzimas transposases, que catalisam a inserção de uma nova cópia do elemento em um outro local do genoma (THIERRY *et al.*, 1990; HERMANS *et al.*, 1991), (2) Seqüências curtas de DNA e repetidas seguidamente denominadas “direct repeat” (DR), “major polymorphic tandem repeats” (MPTR) e “polymorphic GC-rich repetitive sequence” (PGRS) (HERMANS *et al.*, 1991; SMALL & VAN EMBDEN, 1994).

#### 1.7.1 Elementos de inserção presentes no complexo *M. tuberculosis*

O elemento de inserção IS6110 pertence à família dos elementos de inserção IS3, inicialmente descrita em bactérias gram-negativas (McADAM *et al.*, 1990). O IS6110 possui 1.355 pb e apresenta repetições invertidas de 28 pb em ambas as extremidades. O IS6110 foi identificado primeiramente em *M. tuberculosis* (THIERRY *et al.*, 1990) e a seguir encontrado em todo o complexo *M. tuberculosis*, mas não foi observado em outras espécies de micobactérias (CAVE *et al.*, 1991; HERMANS *et al.*, 1990b; VAN SOOLINGEN *et al.*, 1991). Três seqüências do elemento foram descritas: IS6110 (THIERRY *et al.*, 1990), IS986 (McADAM *et al.*, 1990) e IS987 (HERMANS *et al.*, 1991). As seqüências descritas eram praticamente idênticas, diferindo em poucos pares de bases. A seqüência é altamente conservada nos vários isolados. O número de cópias é altamente variável, normalmente 5 a 20 cópias, e estão em várias posições no genoma de isolados clínicos, indicando a instabilidade desse elemento e o alto número de eventos de transposição (VAN EMBDEN *et al.*, 1992). Algumas linhagens sem nenhuma cópia do IS6110 já foram identificadas. A variabilidade da localização genômica em linhagens com poucas cópias de IS6110 parece ser limitada (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1991; 1993). O número de cópias encontrado em muitos isolados de *M. bovis* foi de 1 a 4 (CAVE *et al.*, 1991). Apenas 1 ou 2 cópias do elemento estão presentes nas linhagens de *M. bovis* BCG (HERMANS *et al.*, 1991). MENDIOLA *et al.* (1992) demonstraram através de clonagem e seqüenciamento de regiões que flanqueiam o IS6110 de uma

linhagem contendo 4 cópias desse elemento, que uma das cópias do IS6110 está presente no cromossomo de *M. tuberculosis* no mesmo sítio que a cópia única do elemento presente em *M. bovis* BCG. Esses pesquisadores sugerem a hipótese de que todas as cópias de IS6110 poderiam ser derivadas de uma linhagem do complexo *M. tuberculosis* (ancestral comum) com uma cópia desse elemento.

O elemento de inserção IS1081 possui 1.324 pb e pertence a família dos IS256 originalmente encontrado em *Staphylococcus aureus*. IS1081 é também encontrado em todo o complexo *M. tuberculosis* e *M. xenopi* (COLLINS & STEPHENS, 1991; COLLINS *et al.*, 1993). Normalmente, o número de cópias presente é de 5 a 7 e a sua localização no genoma varia muito pouco nas linhagens de *M. tuberculosis*, tornando difícil distinguir isolados utilizando esse elemento como marcador. Mais de 100 linhagens do complexo foram investigadas e somente 7 diferentes padrões de banda foram identificados. Isto indica a alta estabilidade deste elemento e que os eventos de transposição são bastante raros. Entretanto, IS1081 está presente em *M. bovis* BCG em um fragmento característico gerado pela clivagem do genoma com a endonuclease de restrição *PvuII*. Isto pode ser útil na diferenciação de *M. bovis* BCG de outras linhagens de *M. tuberculosis* (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1992). Essa diferenciação pode ser relevante em situações onde há suspeitas de micobacterioses por reativação de *M. bovis* BCG em pessoas que foram vacinadas (ARMBRUSTER *et al.*, 1990).

Uma seqüência de DNA com características de IS foi também isolada apenas em micobactérias do complexo *M. tuberculosis*. Esta seqüência de 924 pb foi localizada no mesmo locus em todas as espécies analisadas. O gene codifica uma proteína hipotética que apresenta homologia com proteínas codificadas por IS de outros organismos como IS427 e IS869 de *Agrobacterium tumefaciens*, IS402 de *Pseudomonas cepacia* e ISRM4 de *Rhizobium meliloti*. Esses achados sugerem uma possível transferência horizontal de genes entre micobactérias patogênicas e outros organismos (MARIANI *et al.*, 1993).

### 1.7.2 Sequências curtas e repetitivas de DNA

Três tipos dessas seqüências repetitivas foram encontrados no genoma de *Mycobacterium*. O principal tipo de DNA repetitivo, as MPTRs consistiam em seqüências múltiplas de 10 pb intercaladas por seqüências variáveis de 5 pb. Essas seqüências têm sido identificadas no complexo *M. tuberculosis* e em outras espécies de micobactérias (HERMANS *et al.*, 1991). Os 10 pb são heterogêneos na seqüência com um mínimo de 5 pares de bases conservados. Existem especulações que sugerem um papel das MPTRs em rearranjos genéticos e na regulação gênica. MPTR não é normalmente usada em experimentos para diferenciar linhagens porque ocorrem mais de 100 cópias desse elemento no genoma de *M. tuberculosis*.

O segundo tipo de seqüências repetitivas de DNA são as DRs identificadas primeiramente em *M. bovis* BCG (HERMANS *et al.*, 1991). Foram encontradas 49 dessas seqüências com 36 pb (DRs) agrupadas em uma região do genoma (região DR) e intercaladas por seqüências não repetidas com 35 a 41 pb (“spacer”). O número de cópias de DRs no complexo *M. tuberculosis* é de aproximadamente 10 a 50 cópias. Uma linhagem contém vários “spacers” diferentes. Muitos destes ocorrem somente uma vez na região DR, mas alguns são encontrados duas vezes, separados por uma ou mais DRs e outros “spacers”. Quando a região DR de várias linhagens foi comparada, observou-se que a ordem dos “spacers” era praticamente a mesma em todas as linhagens, mas ocorria deleções ou inserções.

A maioria das linhagens de *M. tuberculosis* analisadas possuíam 1 ou mais cópias do elemento de inserção IS6110 nesta região DR na posição da DR 30. Linhagens de *M. tuberculosis* provenientes da Ásia e África carregavam uma única cópia do IS6110 na região DR, na mesma posição, sugerindo que este locus pode ser um “hot spot” para a integração do IS6110 (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1993; SMALL & VAN EMBDEN, 1994). Estudos sobre a natureza da diversidade no número de cópias das DRs demonstraram que eventos de recombinação homóloga ocorriam entre as DRs próximas ou distantes, sugerindo que provavelmente esta é a principal causa do polimorfismo desta região (GROENEN *et al.*, 1993). A seqüência de DNA compreendendo uma DR mais o “spacer” adjacente foi denominada de “direct variable repeat” (DVR). O polimorfismo encontrado nesta região deve-se

principalmente a presença ou ausência de uma ou mais DVRs. O tamanho de uma DVR é 70 pb ou mais. A função da região DR ainda não é conhecida. Observações indicam que muitas das DRs não são essenciais para *M. tuberculosis*. No entanto, a seqüência muito conservada de partes da DR sugerem um componente funcional dessa região.

As seqüências de DNA denominadas PGRS também são pequenas seqüências repetitivas de DNA presentes em múltiplos locus no cromossomo. Foram inicialmente localizadas no complexo *M. tuberculosis* e mais tarde verificou-se a presença em *M. kansasii*, *M. gastri* e *M. szulgae* (ROSS *et al.*, 1992; DWYER *et al.*, 1993). A similaridade na estrutura das PGRS e a MPTRs sugere que esses elementos pertencem a uma família relacionada de seqüências repetitivas de DNA. O mecanismo responsável pela geração de polimorfismo ligado as PGRS ainda não está bem esclarecido.

Os avanços na biologia molecular e o conhecimento de seqüências polimórficas, permitiu o desenvolvimento de métodos altamente específicos para tipificação de espécies e subespécies bacterianas, possibilitando os estudos de epidemiologia molecular. A epidemiologia molecular é a integração de técnicas moleculares para distinguir linhagens específicas de patógenos com métodos epidemiológicos convencionais para entender a distribuição da doença na população (SMALL & MOSS, 1993).

### 1.7.3 Técnicas para detecção de polimorfismo

O conceito de conexão clonal entre isolados de microorganismos de uma mesma fonte de transmissão é importante na epidemiologia de doenças infecciosas. Muitas microepidemias resultam da exposição a uma fonte comum do agente infeccioso. Assim, esses microorganismos derivados de uma mesma origem são clones. Portanto, clones podem ser definidos como culturas bacterianas isoladas de uma mesma fonte em tempos diferentes mas que derivam de uma mesma célula progenitora com fenótipo praticamente idêntico. Geneticamente apresentam muito pouca variabilidade (SMALL & VAN EMBDEN, 1994).

Isolados de uma mesma espécie bacteriana apresentam suficiente diversidade genética para permitir a subtipificação, ou seja, a identificação de diferentes clones ou grupos clonais, pela análise de algumas características genéticas. A subtipificação de espécies isoladas de amostras clínicas, têm muitas aplicações em saúde pública. É essencial para determinar se clones virulentos identificados previamente estão presentes, para localização de fontes de infecção em microepidemias e em casos esporádicos, para monitorizar programas de imunização que visam erradicar o patógeno evitando o surgimento de espécies mutantes.

Métodos de tipificação molecular tem fornecido importantes contribuições à epidemiologia molecular. Esses métodos são baseados na caracterização de macromoléculas como lipopolissacarídeos, ácidos graxos, proteínas e ácidos nucléicos. O desenvolvimento de técnicas de subtipificação baseadas na caracterização de ácidos nucléicos tem incluído análises com endonucleases de restrição, análise de plasmídeos ou DNA genômico, utilização de sondas de DNA e PCR.

#### *1.7.3.1 Análise de DNA por polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição ("Restriction Fragment Length Polymorphism", RFLP)*

As primeiras técnicas de "fingerprinting" aplicadas às micobactérias usavam a coloração com brometo de etídio de fragmentos de DNA genômico separados eletroforéticamente (COLLINS e LISLE, 1984). Entretanto, devido a maioria dos fragmentos de restrição se apresentarem sobrepostos, no mínimo 4 enzimas diferentes eram necessárias para a obtenção de padrões de bandas suficientes para diferenciar linhagens. A utilização dessa metodologia é dificultada pelo grande número de fragmentos que são gerados pelas enzimas de restrição, mesmo quando as análises são feitas utilizando-se programas de computador.

Um dos métodos mais utilizados para detectar diferenças nas seqüências de DNA de *M. tuberculosis* inter ou intra-espécies que não produz mudanças no fenótipo têm sido a análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (MAZUREK *et al.*, 1991; OTAL *et al.*, 1991; VAN SOOLINGEN *et al.*, 1994a; YANG *et al.*, 1994; SAHADEVAN *et al.*, 1995). Este método denominado de

“Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) é uma combinação da técnica de Southern e hibridização com sondas de DNA específicas para produzir “fingerprints” de DNA (SAUNDERS, 1991). O método pode ser altamente discriminatório uma vez que torna possível distinguir linhagens que diferem em um único nucleotídeo na seqüência de DNA. O procedimento utiliza DNA extraído de culturas de bactérias derivadas de espécimes clínicos. O DNA é clivado com endonuclease de restrição e os fragmentos de tamanhos diferentes gerados pela clivagem são separados por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos podem ser transferidos para membranas de náilon por “Southern blotting” e hibridizados com sondas de DNA marcadas com radioisótopos, digoxigenina ou uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina). Os fragmentos gerados são de tamanho variáveis devido ao polimorfismo relacionado com o sítio de clivagem da enzima (SHOEMAKER *et al.*, 1986; DROBNIEWSKI *et al.*, 1994).

Os padrões de RFLP obtidos pela hibridização com elementos de inserção ou outras seqüências de DNA repetitivas, têm sido muito útil na tipificação de isolados. O uso de elementos repetitivos para “fingerprinting” de *M. tuberculosis* foi inicialmente descrito por EISENACH *et al.* (1988). Três enzimas, *Bam*HI, *Sst*II e *Pvu*II, têm sido usadas na maioria dos estudos publicados. Cada uma dessas enzimas cliva dentro do IS6110, produzindo 2 fragmentos para cada cópia do elemento no cromossomo. A endonuclease *Pst*I também tem sido usada, porém, esta enzima não cliva a seqüência dentro do IS6110, e portanto os fragmentos produzidos são maiores e mais difíceis de serem analisados em gel de agarose do que os produzidos por outras enzimas. Num esforço para padronizar o método, vários laboratórios têm concordado em adotar um protocolo comum que utiliza *Pvu*II em combinação com uma sonda que detecta a região direita do IS6110 (VAN EMBDEN *et al.*, 1993). Esta padronização tem permitido a comparação de resultados obtidos em diferentes regiões do mundo. Para uma maior precisão na determinação do tamanho de cada fragmento de restrição gerado, marcadores de peso molecular que não hibridizam com a seqüência de IS6110 são misturados com cada amostra de DNA de *M. tuberculosis* analisado no gel. Após a hibridização com IS6110, a membrana é

rehibridizada com sonda apropriada para esse marcador de peso molecular (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1994a).

Como o IS6110 tem a capacidade de transposição, a expectativa seria que os padrões de DNA baseados neste elemento mudassem com o tempo. A duplicação de 3 pb na seqüência de DNA que flanqueia o elemento sugere que eventos de transposição sejam a causa de RFLP baseados no elemento (McADAM *et al.*, 1990; MENDIOLA *et al.*, 1992). Entretanto, investigações laboratoriais deste fenômeno sugerem que o IS6110 é relativamente estável. Estes padrões foram estáveis durante 6 meses após passagens seriadas em meio líquido (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1991). A maior evidência de estabilidade é a linhagem vacinal BCG. Esta linhagem tem sido propagada em laboratórios diferentes por mais de 6 décadas. No entanto, quase todas as linhagens testadas até agora possuíam uma única cópia do elemento no cromossomo. Somente 3 linhagens possuíam um elemento adicional e o sítio de inserção era o mesmo nas 3 (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1993). As linhagens H37RA e H37Rv demonstraram o maior grau de polimorfismo e eram derivadas de uma linhagem comum H37R, que tem sido mantida separadamente por décadas. Embora ambas carregassem 14 cópias do IS6110, 6 dessas cópias estavam presentes em fragmentos de restrição diferentes (MAZUREK *et al.*, 1991).

Estudos feitos em cobaias sugerem que embora “fingerprints” de DNA baseado no IS6110 possam variar ligeiramente com o tempo, tais modificações não invalidam sua utilização como ferramenta epidemiológica (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1991; TAKAHASHI *et al.*, 1993). Padrões de RFLP de isolados de pacientes com tuberculose crônica não demonstraram mudanças ou tinham padrões que diferiam apenas pela adição ou perda de uma banda (OTAL *et al.*, 1991; SMALL *et al.*, 1993). A comparação de casos isolados em surtos de TB, também tem demonstrado o mesmo padrão de RFLP ou uma banda adicional (DALEY *et al.*, 1992; VAN SOOLINGEN *et al.*, 1991). A investigação sobre a estabilidade do IS6110 em isolados de *M. tuberculosis* de pacientes durante um período de aproximadamente 4 anos, evidenciou um padrão de bandas idêntico ou praticamente idêntico. As causas (resistência a fármacos, abandono e complicações do tratamento) do insucesso no tratamento desses pacientes não interferiram no padrão de RFLP (CAVE *et al.*, 1994).

Este método para tipificação de linhagem é ainda altamente reprodutível e pode ser facilmente analisado por comparação visual quando a amostragem é pequena. Comparações de grande número de amostras podem ser realizadas usando programas de computador especialmente desenvolvidos. A especificidade dos padrões de “fingerprinting” é dependente do número de cópias de IS, ou seja, do número de bandas obtidas no RFLP.

A origem clonal de uma população é melhor demonstrada quando o grau de polimorfismo é elevado. Isolados com padrões idênticos são uma evidência de conexão epidemiológica. Em alguns casos em que o padrão de RFLP obtido possui poucas bandas, outras sondas ou métodos são necessários para verificar a correlação dos isolados. Tais linhagens podem ser diferenciadas usando sondas correspondentes às regiões DR ou PGRS (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1993). Vários padrões de RFLP de DNA de *M. tuberculosis* de isolados de pacientes da cidade de Madras, Índia, não possuíam IS6110 no genoma ou somente uma cópia era encontrada, o que inviabilizava o uso do IS6110 para detectar polimorfismo naquela comunidade. A análise sobre a diversidade clonal foi possível pela utilização de uma sonda correspondente à região DR (SAHADEVAN *et al.*, 1995).

#### **1.7.3.1.1 Aplicação da técnica de RFLP em estudos epidemiológicos**

A confirmação da transmissão de TB em surtos têm sido uma das aplicações principais de métodos de “fingerprinting” de DNA com base na variabilidade do IS6110 (HERMANS *et al.*, 1990b; MAZUREK *et al.*, 1991; TAKAHASHI *et al.*, 1993). A transmissão de TB entre pessoas correlacionadas foi descrita entre vizinhos (GODFREY-FAUSETT *et al.*, 1992), em congregações (DALEY *et al.*, 1992), ambulatórios clínicos (HERMANS *et al.*, 1990b) e infecções nosocomiais (DOOLEY *et al.*, 1992; EDLIN *et al.*, 1992). Os dados obtidos em investigações com indivíduos com AIDS forneceram informações importantes sobre transmissão nosocomial de TB, a rápida progressão da doença e a alta mortalidade quando a infecção é causada por linhagens resistentes a fármacos.

A detecção de transmissão de TB entre pessoas pertencentes a grupos que não estavam previamente correlacionadas pela investigação epidemiológica convencional,

também foi investigada por RFLP. Têm sido demonstrado que isolados de *M. tuberculosis* no mesmo surto de pacientes sem correlação epidemiológica possuíam diferentes padrões de RFLP e pacientes relacionados apresentavam o mesmo padrão (CHEVREL-DELLAGI *et al.*, 1993). Linhagens de *M. tuberculosis* de pacientes com AIDS que possuíam “fingerprinting” idênticos pertenciam a freqüentadores de um mesmo bar (TABET *et al.*, 1994). Também foi demonstrado que havia uma disseminação de determinadas linhagens entre grupos de pessoas sem habitação em Melbourne e Amsterdam (DWYER *et al.*, 1993; VAN SOOLINGEN *et al.*, 1992). A análise de mais de 500 isolados de *M. tuberculosis* provenientes da Cidade de São Francisco (USA) entre 1991 e 1992 demonstrou uma considerável diversidade clonal entre as subespécies e que muitos pacientes eram infectados com uma mesma linhagem. As investigações indicaram algum tipo de conexão entre esses pacientes (SMALL & VAN EMBDEN, 1994).

Problemas referentes a presença de contaminação em laboratórios de micobacteriologia têm sido relatados (VANNIER *et al.*, 1988) e podem ter sérias implicações, desde que o isolamento de uma única colônia de *M. tuberculosis* indica um diagnóstico positivo de TB. A aplicação de tipificação por RFLP para investigar suspeitas de contaminação pode ser útil para identificar o problema e alterar as conseqüências provenientes de um diagnóstico errôneo. SMALL *et al.* (1993) demonstraram através de análises por RFLP que 2 grupos de culturas positivas para *M. tuberculosis* envolvendo 6 pacientes resultavam de contaminação cruzada no laboratório.

Uma outra contribuição da metodologia de “fingerprinting” de DNA é a elucidação dos casos onde a TB pode ser causada por uma infecção adquirida ou por uma reativação da doença. O grau de polimorfismo na população pode de uma forma relativa sugerir entre essas duas causas. Em populações com alto grau de polimorfismo a causa mais provável de TB pode ser por reativação endógena, refletindo a diversidade de tempo e local que os pacientes foram infectados (SAHADEVAN *et al.*, 1995). Em populações onde a TB ocorre em maior número por infecção adquirida o grau de polimorfismo na população é limitado. Uma comparação entre os padrões de RFPL obtidos de isolados de *M. tuberculosis* da

Groenlândia e Dinamarca, onde os habitantes provavelmente tinham contato freqüente uns com os outros, confirmava observações que certos clones do bacilo ficavam restritos a algumas áreas geográficas. O limitado padrão de polimorfismo encontrado sustenta a hipótese de que a limitação física pode levar à evolução de distintos clones. Os dados encontrados sugeriam também que a transmissão de TB entre os habitantes era elevada e que a infecção era preferencialmente adquirida, e não como conseqüência de reativação (YANG *et al.*, 1994). O “fingerprinting” de DNA de uma determinada população pode identificar que populações desenvolvem TB como conseqüência de reativação de infecções latentes ou em que comunidades os programas de combate são pouco eficazes, permitindo assim que medidas profiláticas sejam adotadas.

A possibilidade da TB ocorrer devido à reinfecção exógena com *M. tuberculosis* tem sido motivo de muita discussão. Este fenômeno foi demonstrado em pacientes com AIDS que foram reinfectedados com linhagem de *M. tuberculosis* resistente a múltiplas drogas (MDR), durante ou logo após o tratamento para a linhagem originalmente causadora da doença (SMALL *et al.*, 1993). Essa reinfecção resultava da incapacidade do organismo em desenvolver uma proteção imune e da continuada exposição ao bacilo da TB.

#### 1.7.3.2 Técnicas de tipificação baseadas na amplificação de ácidos nucléicos

A utilização da técnica de PCR para tipificação de amostras oferece algumas vantagens sobre a técnica de RFLP, entre as principais está a rapidez do procedimento, um protocolo mais simplificado e de quantidades mínimas de DNA. Vários métodos de tipificação por PCR têm sido elaborados (PLIKAYTIS *et al.*, 1993; PALITTAPONGARNPIM *et al.*, 1993a, b; BUTLER *et al.*, 1996). Entretanto, comparações com outros métodos já estabelecidos ainda não demonstrou resultados plenamente satisfatórios para serem empregados rotineiramente. Porém, existe sem dúvida um grande potencial para a sua utilização, quando as limitações dessa metodologia forem solucionadas.

ROSS e DWYER (1993) desenvolveram um método para tipificação de *M. tuberculosis* baseado na amplificação por PCR da região genômica onde algumas

cópias do IS6110 estivessem localizadas. A amplificação foi realizada com oligonucleotídeos correspondendo às extremidades do elemento dirigindo a amplificação para a região entre os ISs. Os produtos de PCR eram analisados em gel de agarose. O grau de polimorfismo detectado pela análise do padrão de bandas era similar aos obtidos por “Southern blotting”. A amplificação da região genômica entre o IS e a seqüência MPTR também foi descrita como uma alternativa para detectar polimorfismo nesta região. O polimorfismo detectado nas linhagens de *M. tuberculosis* era devido a variabilidade do sítio de inserção do IS combinado com a localização conservada das seqüências MPTRs. No entanto, o grau de polimorfismo detectado era menor que o encontrado o método de RFLP-IS6110 convencional (PLIKAYTIS *et al.*, 1993).

A técnica de “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) também tem sido utilizada para detectar polimorfismos em seqüências de DNA (WILLIAMS *et al.*, 1990) de microorganismos. Esta técnica é baseada na amplificação de DNA com “primers” aleatórios, o que dispensa o conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada. A amplificação é desenvolvida em condições de baixa estringência, a temperatura de anelamento entre 36 a 45°C, permitindo aos “primers” anelarem em várias regiões. Os “primers” escolhidos normalmente contêm 10 bases com pelo menos 40% de guanina e citosina (G+C). Este método tem a vantagem de ser um processo simples, rápido e de custo inferior a outras metodologias. A amplificação de DNA de *M. tuberculosis* com “primers” aleatórios tem demonstrado produzir padrões de banda que confirmam a correlação entre isolados em determinados grupos (PALITTAPONGARNPIM *et al.*, 1993b).

Um dos métodos de tipificação baseados em PCR denominado PCR-RFLP (REISS & COOPER, 1990), envolve a amplificação de seqüências de ácidos nucléicos conhecidas e após, a clivagem com endonucleases de restrição. O padrão de clivagem gerado pelos fragmentos de restrição de tamanhos diferentes pode então ser comparado. A comparação pode ser feita diretamente em gel de agarose sem a necessidade de experimentos de “Southern blotting” e hibridização. A região escolhida para a amplificação é aquela que possivelmente conterà polimorfismos. O

processo de amplificação pode ser feito diretamente da amostra clínica dispensando a cultura do microorganismo.

“Spacer oligonucleotide typing” (“spoligotyping”) é um novo método de diferenciação de linhagens do complexo *M. tuberculosis*. O método também é baseado na amplificação de segmentos da região DR. O DNA amplificado é hibridizado com um conjunto de oligonucleotídeos derivados da seqüência dos “spacers” presentes na linhagem H37RV (KAMERBEEK *et al*, submetido). O padrão de hibridização é específico da linhagem devido a presença ou ausência da seqüência do “spacer”. Os “fingerprints” gerados podem ser analisados por programas de computador. Apesar do método diferenciar linhagens em menor grau que RFLP convencional (MARCH *et al.*, 1996) a sua utilização em laboratórios clínicos é bastante promissora pela facilidade de processar um grande número de amostras. A execução da metodologia é simples e não requer experimentos de eletroforese e “Southern blotting”. O seqüenciamento de outras regiões DRs de linhagens diferentes pode prover o conhecimento de mais seqüências de “spacer” para aumentar o nível de diferenciação. Entretanto, a utilização do método, tal como foi proposto, em combinação com outro sistema de diferenciação (RFLP) pode ser de grande valor para detecção rápida de surtos e fontes de transmissão (GOYAL *et al.*, 1997).

## **1.8 OBJETIVOS**

Considerando os problemas existentes com os testes diagnósticos conforme exposto anteriormente e a necessidade de caracterizar isolados de *M. tuberculosis* para auxiliar no controle epidemiológico da TB, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de aperfeiçoar o método de diagnóstico de TB por PCR e analisar polimorfismo em DNA de isolados de *M. tuberculosis*.

### **1.8.1 Objetivos específicos**

-Aperfeiçoar um método de diagnóstico laboratorial para TB utilizando a técnica de PCR para amplificação de *M. tuberculosis* em amostras clínicas diferentes.

-Testar a utilidade clínica do método estabelecido para diagnóstico de TB por PCR.

-Caracterizar DNA de *M. tuberculosis* isolados no Rio Grande do Sul por RFLP e “spoligotyping”.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Bactérias e plasmídeo

#### 2.1.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* utilizada era derivada de *E. coli* K12, linhagem TG2 (SAMBROOK *et al.*, 1989) e foi utilizada nos experimentos de clonagem como hospedeira dos plasmídeos pBS e das construções realizadas com esses vetores.

#### 2.1.2 Micobactérias

As espécies de micobactérias utilizadas foram *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. triviale* provenientes de um banco de bactérias do Serviço de Bacteriologia do Laboratório Central (LACEN) do Rio Grande do Sul. Os diferentes isolados de *M. tuberculosis* eram provenientes de material clínico de pacientes da rede de saúde pública do Estado.

#### 2.1.3 Plasmídeo

O plasmídeo pBluescript KS+ foi utilizado na subclonagem de fragmentos provenientes da amplificação de regiões de *M. tuberculosis* (fragmentos Rep e Pab). Esse plasmídeo tem 3,0 kb e resistência à ampicilina (Stratagene).

### 2.2 Enzimas

As enzimas utilizadas foram obtidas da BRL (Bethesda Lesserch Laboratories, Inc.), Pharmacia (Pharmacia, Inc.), Cenbiot (Centro de Biotecnologia/UFRGS) e Amersham (Amersham International, plc.).

### 2.3 “Primers”

Os “primers” utilizados estão listados abaixo e foram sintetizados pela Biosynthesis Inc. e Pharmacia Inc. Os “primers” INS, 1081 e DRs foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Saúde Pública da Holanda (RIVM).

“Primer”	Seqüência (5' - 3')	Referência
Rep1	CCTGCGAGCGTAGGGCGTCGG	EISENACH <i>et al.</i> , 1990
Rep2	CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG	EISENACH <i>et al.</i> , 1990
Pab1	ACCTGGGACGACCCGCAGAT	SJÖBRING <i>et al.</i> , 1990
Pab2	TGCAAGGTCTGCGCGGTGGC	SJÖBRING <i>et al.</i> , 1990
INS-1	CGTGAGGGCATCGAGGTGGC	HERMANS <i>et al.</i> , 1990a
INS-2	GCGTAGGCGTCGGTGACAAA	HERMANS <i>et al.</i> , 1990a
1081-L	TCGCGTGATCCTTCGAAACG	COLLINS & STEPHENS, 1991
1081-9	GCCGTTGCGCTGATTGGACC	COLLINS & STEPHENS, 1991
DR-a	CCGAGAGGGGACGGAAAC	HERMANS <i>et al.</i> , 1991
DR-b	GGTTTTGGGTCTGACGAC	HERMANS <i>et al.</i> , 1991

### 2.4 Sondas

As sondas usadas nos experimentos de hibridização foram derivadas da amplificação de regiões de DNA de *M. tuberculosis* conforme descrito abaixo:

Sonda	“Primers”	Região	Posição	Tamanho (pb)
Rep	Rep1 e 2	IS6110	761-884	123
Pab	Pab1 e 2	gene <i>Pab</i>	629-1149	520
IS6110	INS-1 e 2	IS6110	631-875	244
IS1081	1081-L e 9	IS1081	333-570	237

### 2.5 Amostras clínicas e diagnóstico de TB

Todas as amostras clínicas utilizadas eram provenientes do Serviço de Bacteriologia do Laboratório Central do Rio Grande do Sul (LACEN). As amostras eram enviadas por diferentes Centros de Saúde com ficha de encaminhamento. A

ficha continha dados referentes a sexo, idade, raça, alcoolismo, infecção pelo HIV, tratamento anti-TB e outras doenças associadas. As amostras foram submetidas à baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen e, após tratamento de descontaminação pela técnica de Petroff, à cultura em meio Löwenstein-Jensen (LJ) por 60 dias. Após o cultivo, a identificação das espécies foi feita através de testes bioquímicos (CANETTI & GROSSET, 1968; KUBICA & KENT, 1985). Uma alíquota da amostra (500µl) era separada para ser processada para a análise por PCR.

Um total de 309 amostras de 233 pacientes foi analisado (85 escarros, 26 lavados brônquios-alveolares (LBA), 70 líquors, 67 soros, 9 líquidos pleurais, 2 líquidos ascíticos, 1 líquido pericárdico e 13 urinas). Inicialmente, 130 amostras de 100 pacientes foram usadas para estabelecer o protocolo. As amostras eram de pacientes com diagnóstico de TB (70 amostras) e de pacientes sem TB (60 amostra), usadas como controle. Um outro grupo de mais 179 amostras de 133 pacientes suspeitos de TB foram analisadas por PCR usando exclusivamente o protocolo desenvolvido neste trabalho. As amostras foram coletadas no período de 1994-1995. Todos os resultados de PCR foram comparados ao diagnóstico clínico e bacteriológico. Os dados sobre os diagnósticos clínico e bacteriológico eram conhecidos somente após a conclusão dos testes de PCR. O diagnóstico de TB era estabelecido através de testes microbiológicos convencionais e critérios terapêuticos (suspeita clínica de TB com a resolução do processo após tratamento).

## **2.6 Meios de crescimento e manutenção dos organismos**

Foram utilizados os meios de cultura LB, TSB, nas formas líquidas e sólidas preparadas de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989). O meio LJ usado para a cultura de micobactérias foi preparado conforme descrito no Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 1994).

## **2.7 Soluções**

### **2.7.1 Tampão TE**

-Tris-Cl 10 mM (pH 8,0);

-EDTA 0,1 mM (pH8,0).

UFRU  
BIBLIOTECA SETORIAL DE  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS

2.7.2 Solução de lisozima

Solução a 50 mg/ml em Tris-Cl 10 mM (pH 7,4). Estocada a -20°C.

2.7.3 Solução de Proteinase K

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

2.7.4 Tampão de lise

-Triton X-100 0,3%

-EDTA 87 mM (pH 8,0)

-Tris-Cl 150 mM (pH 7,8)

2.7.5 Solução de SDS/Proteinase K (para cada amostra)

-proteinase K (2.7.3) 5 µl

-SDS 10% 70 µl

2.7.6 Solução de 5 M NaCl

-NaCl (Merck) 29,2% em água destilada.

2.7.7 Solução de CTAB/NaCl

-NaCl 4,1%;

-CTAB (N-cetil-N,N,N,-trimetil brometo de amônio, Merck) 10%.

2.7.8 Fenol

Fenol saturado com Tris-Cl mM (pH 8,0) contendo 0,1% de hidroxiquinoleína.

2.7.9 Fenol-clorofórmio

Fenol previamente saturado adicionado de um volume de clorofórmio.

2.7.10 Clorofórmio/álcool isoamílico

-Clorofórmio 24V;

-Álcool isoamílico 1V.

2.7.11 Tampões de clivagem para enzimas de restrição

Os tampões de clivagem utilizados para clivagem do DNA em endonucleases de restrição, eram preparados conforme especificações descritas pelo fabricante.

2.7.12 Tampão de ligação 10X

-Tris-Cl 0,5M (pH 7,5);

- MgCl<sub>2</sub> 100 mM;

-DTT 100mM;

-ATP 10 mM;

-BSA 1 mg/ml.

2.7.13 Tampão TEB 1X (Tris-borato-EDTA)

-Tris-OH 89 mM;

-EDTA 2,5 mM;

-ácido bórico 89 mM;

-pH 8,2.

2.7.14 Solução estoque de acrilamida

-acrilamida 30%;

-bisacrilamida 0,8%.

2.7.15 Denhardt 50X (DENHARDT, 1966)

-Ficoll 400.000 1%;

-Polivinilpirrolidona 1%;

-BSA 1%.

2.7.16 SSC 20X

-NaCl 3 M;

-citrato de sódio 0,3 M.

2.7.17 Solução de pré-hibridização

-SSC 5X;

-sulfato de dextran 2,5%;

-SDS 0,1%;

-esperma de salmão 100 µg/ml.

#### 2.7.18 Solução de hibridização

-SSC 5X;

-bloto 2,5%;

-SDS 0,1%;

-esperma de salmão 100 µg/ml.

#### 2.7.19 Tampão de reação de PCR

-Tris-Cl 10 mM (pH8,3);

-KCl 50 mM;

-MgCl<sub>2</sub> 3 mM;

-gelatina 0.0001%.

#### 2.7.20 Tampão de amostra de DNA 5X

-Ficol 400.000 25%;

-azul de bromofenol 0,25%;

-xilenocianol 0,25%.

#### 2.7.21 Tampão de amostra de DNA com RNase

-glicerol 50%;

-Tris-Cl 50 mM (pH 7,5);

-EDTA 5 mM;

-azul de bromofenol 0,05%;

-RNase 30 µg/ml.

#### 2.7.22 SSPE 10X

-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O 0,1 M;

-NaCl 1,8M;

-EDTA 10 mM.

#### 2.7.23 Tampão de lavagem primária

-uréia 36%

-SDS 4%

-SSC (20X) 2,5%

#### 2.7.24 Tampão de lavagem secundária

-SSC 2X

## 2.8 Extração de DNA

### 2.8.1 Extração de DNA de culturas de micobactérias

#### 2.8.1.1 Extração com “glass beads”

As células bacterianas crescidas em LJ por período de 4 semanas eram colhidas e ressuspendidas em 400 µl de TE (2.7.1). O DNA era então extraído pelo método descrito por SANTOS *et al.* (1992). Este método utilizava 750 µl de “glass beads” (Sigma) para promover a lise celular e o DNA liberado era purificado com igual volume de fenol-clorofórmio e precipitado com isopropanol. O DNA precipitado, lavado e secado a temperatura ambiente foi ressuspendido em 100 µl de TE. A concentração foi determinada por medida densidade ótica a 260 nm.

#### 2.8.1.2 Extração com CTAB

Conforme descrito por VAN SOOLINGEN (1994b). As micobactérias crescidas em LJ por um mínimo de 4 semanas foram transferidas para um tubo de microcentrífuga com 400 µl de TE e aquecidas por 20 min a 80°C. Após, foram adicionados lisozima, SDS/proteinase K (2.7.5) e solução de CTAB/NaCl (2.7.7), o DNA liberado foi purificado com clorofórmio/álcool isoamílico (2.7.10). Posteriormente, o DNA foi precipitado com etanol, recolhido por centrifugação e secado a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 20 µl de TE e as concentrações determinadas por medida de densidade ótica a 260 nm.

## 2.8.2 Extração de DNA de amostras clínicas

### 2.8.2.1 Extração por fervura

Uma alíquota de 500 µl de amostra clínica foi concentrada por centrifugação (12.000 rpm por 10 min). O centrifugado foi lavado 3 vezes com TE como descrito por KOCAGÖZ *et al.*, (1993). O sedimento foi ressuspensionado em 50 µl de TE e fervido por 10 min. Após nova centrifugação, 10 µl do sobrenadante foi separado para ser amplificado por PCR.

### 2.8.2.2 Extração com pó de vidro

Para a extração com pó de vidro, 30 µl do sobrenadante obtido anteriormente (2.8.2.1) foi misturado com 5 µl de pó de vidro (Sephaglas™, Band-Prep Kit, Pharmacia), agitado e incubado por 5 min a temperatura ambiente. A mistura foi então centrifugada a 12.000 rpm por 1 min e o sobrenadante cuidadosamente removido. O centrifugado (DNA/pó de vidro) foi lavado com álcool 70% e centrifugado como na etapa anterior. A lavagem foi repetida duas vezes. O centrifugado foi secado por aproximadamente 10 min a temperatura ambiente e ressuspensionado em 30 µl de TE e centrifugado novamente como descrito acima. 10 µl do sobrenadante foi usado na reação de PCR.

## 2.8.3 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

Para a extração de DNA plasmidial utilizou-se o método de lise com triton. Uma colônia isolada de bactéria portadora do plasmídeo foi inoculada em 3 ml de meio LB e incubado a 37°C com agitação por 14-16 horas. Foram coletados 1,5 ml da cultura de células por centrifugação (12000 rpm por 30 seg) e ressuspensionadas em 300 µl de tampão TS (Tris-Cl 50 mM pH 8,0; 25% sacarose) em banho de gelo. Após, foram adicionados 3 µl de lisozima (2.7.2) e 4 µl de RNase (30µg/µl) e 7,5 µl de EDTA 0,5 M, pH 8,2 e incubados por 15 min em banho de gelo. Posteriormente, foram adicionados 150 µl de tampão de lise (2.7.4) com moderada agitação e então incubados em gelo por 5 min. Após, as células lisadas foram centrifugadas a 12000

rpm por 20 min em centrífuga refrigerada a 4°C, e ao sobrenadante foram adicionados 300 µl de água miliQ autoclavada. Este sobrenadante foi extraído sequencialmente com 1 volume de fenol tamponado (2.7.8), 1 volume de fenol-clorofórmio (2.7.9) e 1 volume de clorofórmio. A fase aquosa foi coletada e adicionada de NaCl 50 mM e 1 volume de isopropanol. A solução foi incubada a -20°C por 30 min. O DNA foi coletado por centrifugação (12000 rpm por 15 min), lavado com etanol 70%, secado em estufa a 37°C e ressuspendido em TE a 4°C por 16 horas. Posteriormente o DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7% (SAMBROOK *et al.*, 1989).

## 2.9 Análise de DNA

### 2.9.1 Eletroforese em gel de agarose

O procedimento foi realizado conforme descrito por MANIATIS *et al.*, (1982). Foi utilizado gel de agarose numa concentração de 0,7 a 2,0%, preparado em tampão TEB 1X (2.7.13) e brometo de etídio para concentração final de 0,25µg/ml. O tampão de corrida utilizado foi TEB 1X. O gradiente de voltagem aplicado foi de 5 a 8 V/cm de gel com tempo de migração variado. As amostras foram preparadas adicionando-se tampão de amostra (2.7.20) na proporção de 1:5 do volume total de amostra. Após a eletroforese o gel foi visualizado em transiluminador de UV de comprimento de onda curto. Para o cálculo de tamanho de fragmentos de DNA foi realizada a migração de fragmentos padrões de peso molecular conhecido.

### 2.9.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para análise de fragmentos de DNA menores que 500 pb, foi utilizada a eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, conforme descrito em MANIATIS *et al.* (1982). O gel (6%) era feito diluindo a acrilamida (2.7.14) em tampão TEB 1X. Foi aplicado ao sistema 50 V por aproximadamente 4 horas. Após a eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de UV de comprimento de onda curto.

## 2.10 Purificação de fragmentos de DNA

Foi utilizado o sistema "Sephaglas band prep Kit" (Pharmacia) para purificação de fragmentos de DNA separados em gel de agarose para serem clonados ou serem usados como sonda nos experimentos de hibridização. Fragmentos de DNA usados como sonda na técnica de RFLP foram purificados diretamente da reação de amplificação com o sistema "plasmid Mid Kit" (Quiagen). A quantidade de DNA recuperada correspondia a 60-70% da quantidade inicial.

## 2.11 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As reações de clivagem foram feitas utilizando o tampão de reação adequado à atividade de cada enzima, conforme indicação do fabricante. Geralmente foram utilizados de 1 a 5 U de enzima para cada  $\mu\text{g}$  de DNA.

## 2.12 Transferência de DNA de géis de agarose para membranas de náilon

O procedimento adotado nas transferências foi, basicamente, aquele descrito por SOUTHERN (1975). Foram utilizadas membranas de náilon Hybond-N e Hybond-N+ (Amersham).

## 2.13 Marcação de DNA

### 2.13.1 Marcação de DNA com $^{32}\text{P}$

Fragmentos de DNA utilizados como sonda foram marcados pela técnica de "random primer" (SAMBROOK *et al.*, 1989). Aproximadamente 50 ng de DNA foram marcados com  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (3000 Ci/mmol, ICN) e a atividade específica obtida foi entre  $10^7$ - $10^9$  cpm/ $\mu\text{g}$  de DNA. O DNA marcado foi separado dos dNTPs não incorporados em coluna de Sephadex G-50 (Pharmacia).

### 2.13.2 Marcação de DNA com peroxidase

Fragmentos de DNA utilizados como sonda foram marcados com a enzima peroxidase pelo sistema ECL™ (Amersham). Em torno de 200 ng de DNA foram marcados.

## 2.14 Hibridização e detecção de fragmentos de DNA

### 2.14.1 Hibridização de DNA com sondas marcadas com <sup>32</sup>P

As membranas de náilon com DNA fixado (2.13) foram incubadas em solução de pré-hibridização (2.7.17), num volume de pelo menos 0,2 ml/cm<sup>2</sup> de membrana, com agitação suave, a 60°C, por 3 h. Ao final deste tempo, a solução foi trocada por solução de hibridização (2.7.18), num volume de 50µl/cm<sup>2</sup> de membrana, acrescida de sonda marcada com <sup>32</sup>P (2.13.1), previamente desnaturada a 100°C, por 5 min. A membrana foi incubada por 14-16 h, a 60°C, com agitação. Seguiam-se 6 lavagens de 15 min, com agitação suave, em condições decrescentes de força iônica. As 5 primeiras a 60°C e a última à temperatura ambiente. A primeira lavagem foi feita com uma solução contendo SSC 5X (2.7.16) e 0,1% SDS; a segunda com uma solução contendo SSC 2X e 0,1% SDS; a terceira com uma solução contendo SSC 1X e 0,1% SDS; a quarta continha SSC 0,5% e 0,1% SDS; a quinta com solução de SSC 0,2X e 0,1% SDS; e a última com SSC 0,1X.

O resultado das hibridizações foi detectado por auto-radiografia, obtida em filme radiográfico (Kodak X-Omatic), exposto à membrana a -70°C, por no mínimo 14-16 h.

### 2.14.2 Hibridização de DNA com sonda marcada com peroxidase

O sistema usado para hibridização e detecção com sonda marcada com peroxidase foi ECL™ (Amersham). A membrana (Hybond-N+) contendo os fragmentos de DNA foi processada conforme orientação do fabricante. A quantidade de sonda usada por membrana foi de 200 ng. Quatro lavagens foram realizadas com leve agitação. Duas com tampão de lavagem primário pré aquecido a 42°C (2.7.23)

por 20 min a 42°C; Duas, com tampão de lavagem secundário (2.7.24) à temperatura ambiente.

A detecção da hibridização foi realizada seguindo rigorosamente as recomendações do Sistema ECL. O resultado foi detectado também por autoradiografia, obtida em filme radiográfico (RPN, Amersham), exposto a membrana, primeiramente, por 1 min. Um novo filme era exposto então por 5-120 min.

Quando as membranas foram reutilizadas para hibridização do mesmo DNA transferido com outra sonda, a membrana foi tratada conforme protocolo da Amersham.

## **2.15 Amplificação de fragmentos de DNA por PCR**

### **2.15.1 Reação de amplificação**

DNA total de *M. tuberculosis* foi amplificado por PCR. As reações de amplificação foram desenvolvidas em volumes de 50 µl contendo tampão de reação 1X (2.7.19), 40 pmois de cada “primer” e 1 a 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Cenbiot, UFRGS). Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador de DNA Perkin Elmer Cetus. As reações foram realizadas por 30 ciclos de 2 min a 94°C, 2 min a 68°C e 2 min a 72°C. O controle negativo da reação era realizado substituindo-se o DNA por H<sub>2</sub>O MilliQ. No controle positivo era utilizado um DNA do complexo *M. tuberculosis* previamente positivo por PCR.

### **2.15.2 Detecção dos produtos**

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram analisados por eletroforese em géis de agarose 0,8 a 2,0% (2.9.1) e gel de poliacrilamida 6% (2.9.2), corados pelo brometo de etídio e visualizados através de um transiluminador de ultravioleta. As amostras eram consideradas positivas quando apresentavam uma banda correspondente a um fragmento de DNA com o mesmo tamanho do fragmento de DNA do controle positivo. Quando necessário, o gel de agarose era desnaturado, neutralizado e os DNAs transferidos para membranas de náilon (2.12) para serem

hibridizados com sonda específica (2.14). Quinze  $\mu$ l da reação de amplificação eram colocados no gel para eletroforese. O padrão de peso molecular utilizado para comparação dos produtos amplificados era 1 Kb DNA ladder.

### **2.16 Clonagem e seqüenciamento dos fragmentos de DNA amplificados por PCR**

O fragmento de DNA amplificado e purificado (2.10) foi tratado para ser clonado conforme STARR & QUARANTA (1994). O DNA foi incubado com T4 DNA polinucleotideo quinase (Enzibiot) e DNA polimerase I (Boehinger Mannheim) e novamente purificado.

O DNA tratado foi ligado com o vetor pBSK+ (previamente digerido com a enzima de restrição *EcoRV* e defosforilado com fosfatase alcalina para evitar a religação) e novamente purificado. A transformação bacteriana foi realizada por eletroporação (DOWER *et al.*, 1988) de células competentes de *E. coli* TG2. As bactérias foram plaqueadas em meio YT com ampicilina, IPTG e X-Gal. As colônias brancas foram isoladas e os plasmídeos extraídos (2.8.2.3). A presença dos clones recombinantes foi analisada por clivagem com enzima de restrição e eletroforese em gel de agarose (2.9.1).

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos utilizando o kit "Plasmid Mid Kit" (Quiagen) e seqüenciados manualmente usando-se o kit de seqüenciamento "T7 Sequencing™ Kit" (Pharmacia). A comparação das seqüências de nucleotídeos foi feita através do programa de computador Analyseq.

### **2.17 Condições de amplificação por PCR para o diagnóstico de TB**

A reação de PCR para o diagnóstico de PCR de TB foi otimizada conforme descrito na secção (2.15.1), com 2,5 U de Taq polimerase e "primers" Rep 1 e 2. A reação foi processada utilizando DNA extraído de amostras clínicas. Foram realizados 35 ciclos com temperatura de anelamento de 68°C. O controle positivo e negativo eram sempre incluídos na reação (2.15.1). 15  $\mu$ l da reação foi analisado em gel de agarose 2%.

## **2.18 Determinação de sensibilidade do PCR em amostras clínicas**

Para determinar a sensibilidade do PCR na detecção de DNA extraído de amostras clínicas e purificado com pó de vidro, foram realizadas diluições seriadas em água (10X) de *M. tuberculosis* H37Rv crescido em meio Sauton. 100 µl de cada diluição foi adicionado a 500 µl de uma mistura de amostra clínica (escarro, líquido e soro) previamente cultura e PCR negativos para *M. tuberculosis*. O DNA foi extraído e após ser tratado com pó de vidro foi usado nos experimentos de PCR. Igual porção de cada diluição foi cultivado em LJ para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *M. tuberculosis*. Como controle do experimento, a mesma diluição foi realizada em TE em substituição a mistura de amostras.

## **2.19 Caracterização de *M. tuberculosis***

Os experimentos de caracterização de *M. tuberculosis* através de detecção de polimorfismo de DNA foram realizados no National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Holanda. Os DNAs de *M. tuberculosis* analisados foram isolados no Rio Grande do Sul.

### **2.19.1 Análise de DNA por RFLP**

A técnica de RFLP utilizada foi basicamente desenvolvida conforme protocolo estabelecido por VAN SOOLINGEN *et al.* (1994b). A técnica incluía o crescimento de isolados de *M. tuberculosis* em LJ com incubação a 37°C por 3 semanas. Da massa bacteriana crescida foi extraído o DNA pelo método de CTAB (2.8.1.2). A concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro (Gen-Quant, Pharmacia).

#### **2.19.1.1 Digestão de DNA extraído de culturas**

O DNA foi digerido com a endonuclease de restrição *PvuII* e os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% para análise de clivagem e confirmação de concentração necessária. A seguir, as preparações escolhidas eram separadas em gel de agarose 0,8% (16X20 cm) para o Southern blotting. Os fragmentos dos produtos da digestão separados foram transferidos para membrana de náilon (Hybond-N+, Amersham) (2.13). As membranas foram

hibridizadas com sondas correspondendo ao IS6110 e IS1081 (2.4) e marcadas com peroxidase (2.14.2).

#### 2.19.1.2 Preparo das sondas

Duas sondas diferentes foram utilizadas nos experimentos de caracterização de *M. tuberculosis* por RFLP para gerar diferentes “fingerprints”. As sonda IS6110 e IS1081 eram preparadas por PCR conforme descrito em VAN SOOLINGEN *et al.* (1994b) e purificadas por eletroforese em gel de agarose. As sondas foram marcadas por método não radioativo (peroxidase) ECL™ (Amersham) conforme instruções do fabricante.

#### 2.19.1.3 Hibridização e Detecção

O sistema utilizado para hibridização e detecção foi o ECL™ Direct System (2.15.2). O sistema envolve a marcação direta da sonda com a enzima peroxidase. A marcação é realizada com a completa desnaturação da sonda. Assim, a fita simples de DNA carregada negativamente é ligada eletrostaticamente a enzima que está complexada a um polímero com carga positiva. A ligação covalente entre a enzima e o DNA é promovida pela adição de glutaraldeído à reação. A sonda marcada é então usada para hibridizar com os fragmentos de DNA na membrana. A peroxidase catalisa a oxidação do substrato luminol que, na presença de um ativador, resulta na emissão de luz, que é prontamente detectada em filme de RaioX.

Para facilitar a determinação do tamanho dos fragmentos detectados foi utilizado um marcador de peso molecular (DNA de lambda digerido com *Hind*III e DNA de PhiX174 digerido com *Hae*III) e um marcador interno (MI) (DNA ladder supercoiled digerido com *Pvu*II e DNA PhiX174 digerido com *Hae*III). O MI foi adicionado a cada amostra de DNA de *M. tuberculosis* digerida para corrida eletroforética. O MI foi visualizado pela hibridização dos fragmentos de DNA contidos da membrana com ambos os DNAs íntegros utilizados como sonda marcada pelo mesmo sistema ECL. DNA de *M. tuberculosis* linhagem Mt 14323 (Instituto

Nacional de Saúde Pública, Holanda) foi incluído em cada gel como controle do procedimento.

#### *2.19.1.4 Análise dos padrões gerados por RFLP*

Os padrões de banda obtidos por hibridização com as sondas IS6110 e MI foram analisadas em computador através do programa "Gelcompar", versão 3.10 (Kortrijk, Bélgica). Os fragmentos de restrição foram comparados pela sobreposição das autoradiografias contendo os "fingerprints" de DNA gerados por hibridização com a sonda IS6110 com as autoradiografias contendo os "fingerprints" de DNA produzidos por hibridização com a sonda MI. Este procedimento permitia normatizar a posição de cada fragmento independente da autoradiografia, posição no gel e possíveis distorções relacionadas com o gel.

O controle do procedimento era realizado pela comparação com o "fingerprinting" da linhagem Mt 14323, presente durante todas as etapas do experimento.

### 2. 19.2 Análise de DNA por "spoligotyping"

A análise de DNA por "spoligotyping" foi realizado conforme descrito por KAMERBEEK *et al.* (Submetido à publicação). O método consistia em amplificar a região DR de *M. tuberculosis* para obter fragmentos de DNA com a seqüência correspondente aos "spacers".

#### *2.19.2.1 Reação de amplificação*

A reação de amplificação foi realizada com "primers" DR-a e HDR-b ("primer" reverso e biotilado) nas condições descritas. Os fragmentos de DNA amplificados eram visualizados em gel de agarose 1,5%.

#### *2.19.2.2 Hibridização e detecção*

Os produtos de PCR foram então hibridizados com um conjunto de 43 oligonucleotídeos derivados das seqüência de "spacers" da linhagem *M. tuberculosis*

H37Rv e *M. bovis* BCG ligados em uma membrana "Biodyne C" (Pall Biosupport, Glen Cove, NY, USA). Os "primers" eram sintetizados com um aminogruppo livre na extremidade 5' para permitir uma ligação covalente com a membrana quando esta era ativada com 16% 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Os produtos de PCR não ligados aos oligonucleotídeos da membrana eram lavados e os ligados eram detectados pela incubação com streptoavidina marcada com peroxidase. Após lavagens, a membrana era incubada com líquido de detecção ECL. A detecção da hibridização era realizada por exposição da membrana a um filme de Raio X (Amersham).

Os oligonucleotídeos eram aplicados em linhas paralelas na membrana, enquanto que, os produtos de PCR eram colocados para hibridizar em perpendicular as linhas dos oligonucleotídeos.

#### 2.19.2.3 Análise dos padrões de hibridização.

Os padrões de hibridização gerados por "spoligotyping" foram analisados em computador através do programa "Gelcompar" conforme descrito em 2.19.4. DNA de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG foram utilizados como controles.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Aperfeiçoamento de Método de Diagnóstico Laboratorial para Tuberculose

Com o objetivo de desenvolver um sistema de diagnóstico de TB baseado na técnica de PCR, foram realizados experimentos para estabelecer e padronizar todas as etapas do procedimento para a amplificação e detecção de fragmentos de DNA de *M. tuberculosis*.

#### 3.1.1 Seleção da região genômica para amplificação

Para determinar qual a região cromossômica de *M. tuberculosis* mais adequada para ser utilizada como alvo de ampliações, foram sintetizados 2 pares de “primers”. Os “primers” Pab1 e Pab2 (Pab), complementares a uma região do gene de cópia única que codifica o antígeno Pab presente no complexo *M. tuberculosis* (ANDERSEN & HANSEN, 1989). O fragmento de DNA gerado por amplificação possuía 520 pb (fragmento Pab) e um sítio interno para a endonuclease de restrição *SalI*. A digestão com a enzima produzia 2 fragmentos de DNA (170 e 350 pb).

Os “primers” Rep1 e Rep2 (Rep) eram complementares a região do elemento de inserção IS6110 presente em múltiplas cópias no complexo *M. tuberculosis*. Um fragmento de DNA com 123 pb (fragmento Rep) era produzido por amplificação e também possuía um sítio interno para *SalI* conforme descrito por EISENACH *et al.* (1990). A digestão com a enzima gerava 2 fragmentos de aproximadamente 60 pb.

#### 3.1.2 Amplificação de DNA extraído de culturas

##### 3.1.2.1 A reação de PCR

As condições de amplificação foram estabelecidas com DNA do complexo *M. tuberculosis* extraído de culturas. A reação de PCR foi, inicialmente, padronizada com os “primers” Pab e Rep utilizando DNA de *M. bovis* BCG. A quantidade de DNA genômico para a amplificação foi estabelecida em 100 ng. Para confirmar as condições de padronização de reação de PCR, DNA de 13 isolados diferentes de *M. tuberculosis* foram amplificados com os “primers” Rep. DNA de *M. bovis* foi utilizado como controle positivo. Um fragmento de tamanho correspondente a 123 pb

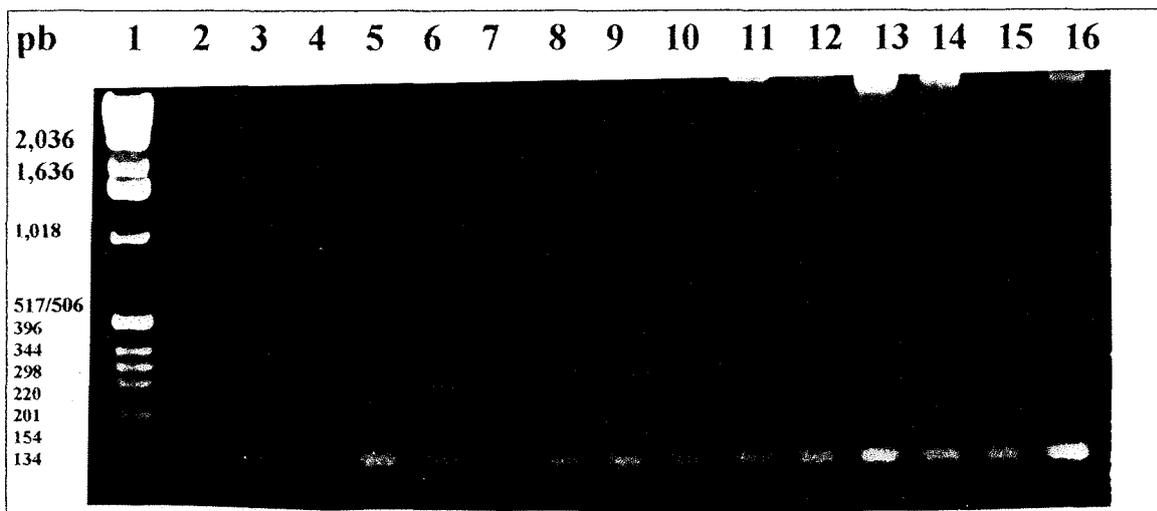
foi detectado em gel de agarose em todas as reações de PCR. Em 4 amostras foi visualizado um fragmento adicional de 300 pb (FIGURA 3.1 A, linhas 6,9,11,12). Nove desses DNAs foram amplificados por PCR utilizando “primers” Pab. Somente um fragmento de DNA de 520 pb foi evidenciado em gel da agarose 0,8%. Da análise desses géis de agarose contendo os produtos de PCR obtidos em ambas as reações era possível constatar que os fragmentos de DNA amplificados com os “primers” Pab eram mais eficientemente amplificados e detectados que os amplificados com Rep. No gel de agarose da FIGURA 3.1A era possível visualizar além do fragmento Rep, DNA cromossomal, de *M. tuberculosis*, e "primers" que não foram utilizados na reação de amplificação. A melhor detecção do fragmento Pab em gel de agarose, provavelmente, era devido ao tamanho do fragmento. Fragmentos de DNA maiores são visualizados mais facilmente. No entanto, apesar desse resultado, a amplificação de DNA extraído de amostras clínicas foi melhor definida com “primers” Rep ao invés de Pab conforme descrito adiante.

#### **3.1.2.2 Confirmação da seqüência amplificada**

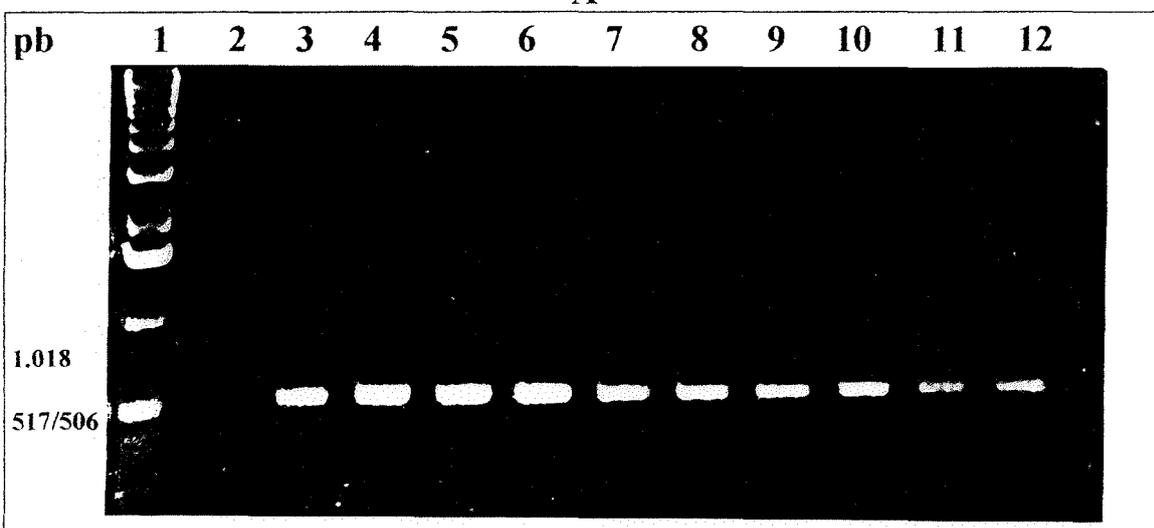
Para determinar se os fragmentos de DNA amplificados nas reações de PCR com os “primers” escolhidos possuíam a seqüência alvo, foram realizados experimentos de digestão desses DNA com a endonuclease de restrição *SalI* e seqüenciamento.

##### **3.1.2.2.1 Padrão de clivagem dos fragmentos de DNA com *SalI***

Os fragmentos de DNA Pab e Rep obtidos por amplificação de DNA de *M. tuberculosis* foram digeridos com *SalI*. A digestão parcial de 3 fragmentos Pabs diferentes gerou fragmentos de tamanho esperado (370 e 150 pb) que podiam ser visualizados em gel de poliacrilamida 6% (FIGURA 3.2) A digestão parcial de 9



A



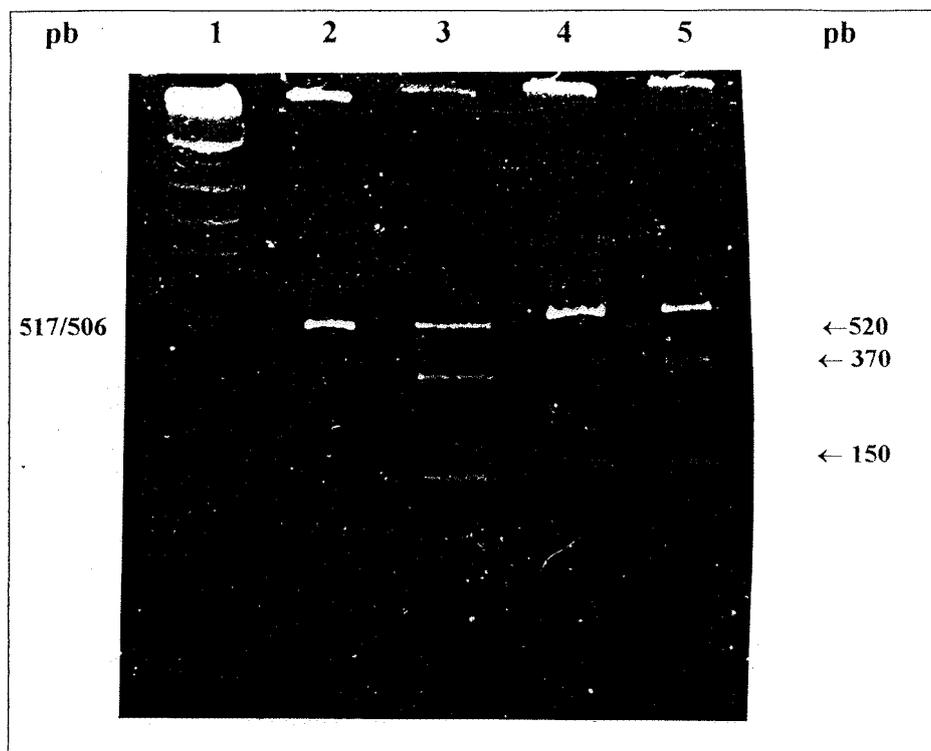
B

**FIGURA 3.1** Análise eletroforética de produtos de PCR obtidos pela amplificação de DNA do complexo *M. tuberculosis*

Os produtos de PCR foram obtidos pela reação de amplificação de DNA de *M. tuberculosis* de isolados diferentes, extraídos de cultura. As condições de amplificação foram conforme descrito em 2.15. Os controles utilizados foram o positivo (DNA de *M. bovis*) e controle negativo ( $H_2O$  MilliQ). O padrão de peso molecular foi 1Kb DNA ladder. Uma alíquota da 15 $\mu$ l de reação de PCR foi aplicada no gel.

**A-** Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%. A reação de PCR foi realizada com "primers" Rep. Linha 1, padrão de peso molecular. Linha 2, controle negativo. Linhas 3-15, amostras de DNA de *M. tuberculosis*. Linha 16, controle positivo.

**B-** Os produtos de PCR foram submetidos a gel de agarose 0,8%. A reação de PCR foi realizada com "primers" Pab. Linha 1, padrão de peso molecular. Linha 2, controle negativo. Linhas 3-11, amostras de DNA de *M. tuberculosis*. Linha 12, controle positivo.



**FIGURA 3.2 Análise eletroforética de fragmentos de DNA Pab do complexo *M. tuberculosis* digeridos com *SalI***

Os fragmentos de DNA Pab (520pb) foram digeridos com a endonuclease de restrição *SalI* e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Linha 1, padrão de peso molecular. Linha 2, fragmento Pab íntegro amplificados a partir de DNA de *M. bovis* BCG. Linha 3, mesmo fragmento digerido. As demais linhas mostram fragmento Pab digeridos após serem obtidos por amplificação de DNA de *M. tuberculosis* isolado de culturas de amostras clínicas. A reação de amplificação foi realizada com os “primers” Pab1 e Pab2.

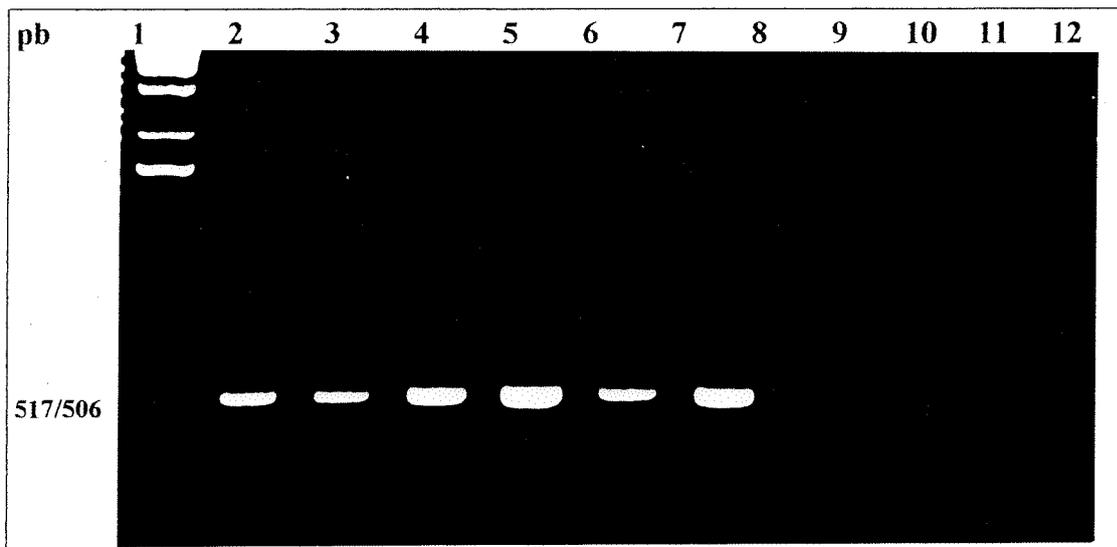
fragmentos Repts gerou fragmentos de DNA de aproximadamente 60 pb detectáveis em gel de poliacrilamida 6% (dados não mostrados), sugerindo assim que os fragmentos amplificados com os "primers" específicos, possivelmente, correspondiam a seqüência alvo.

#### 3.1.2.2 *Análise das seqüências dos fragmentos de DNA*

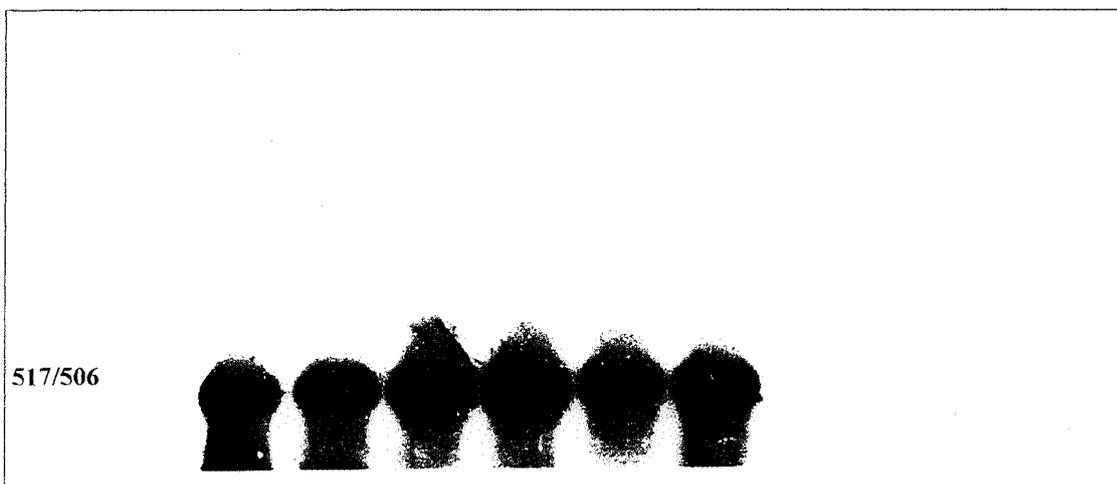
Para analisar o grau de homologia entre as seqüências de nucleotídeos amplificadas e as seqüências alvo descritas na literatura, os fragmentos purificados, foram então seqüenciados. O seqüenciamento foi realizado após os fragmentos serem clonados em vetor pBSK+ no sítio de restrição *EcoRV*. O fragmento Rep foi totalmente seqüenciado e a análise de seqüência demonstrou 100% de homologia com a descrita (EISENACH *et al.*, 1990). A seqüência do fragmento Pab foi parcialmente determinada (aproximadamente 150 pb de cada uma das extremidades). A comparação com a seqüência de bases do gene *Pab* publicada (ANDERSEN & HANSEN, 1989) demonstrou 100% de homologia.

#### 3.1.2.3 *Análise da especificidade dos "primers"*

Para testar a especificidade dos "primers" escolhidos, DNAs de 34 isolados diferentes de *M. tuberculosis* e 16 DNAs de outras 8 espécies de micobactérias (2 isolados de cada espécie de *Mycobacterium*) foram utilizados em reações de amplificação com ambos os "primers". Após a análise eletroforética em gel de agarose, os fragmentos amplificados foram transferidos para membrana de náilon. Cada membrana foi hibridizada com a sonda correspondente ao fragmento, sonda Rep e Pab, marcadas com <sup>32</sup>P. Os fragmentos de DNA utilizados como sonda foram aqueles descritos anteriormente. A análise do DNA de algumas dessas reações PCR é apresentada na FIGURA 3.3. No gel de agarose e na autoradiografia foi possível detectar um fragmento de tamanho esperado (520 pb) nas reações de amplificação com "primers" Pabs realizadas com DNAs de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Nenhum fragmento foi visualizado com as outras espécies de micobactérias. Quando a reação de amplificação foi realizada com "primers" Repts, o fragmento específico de 123 pb



A



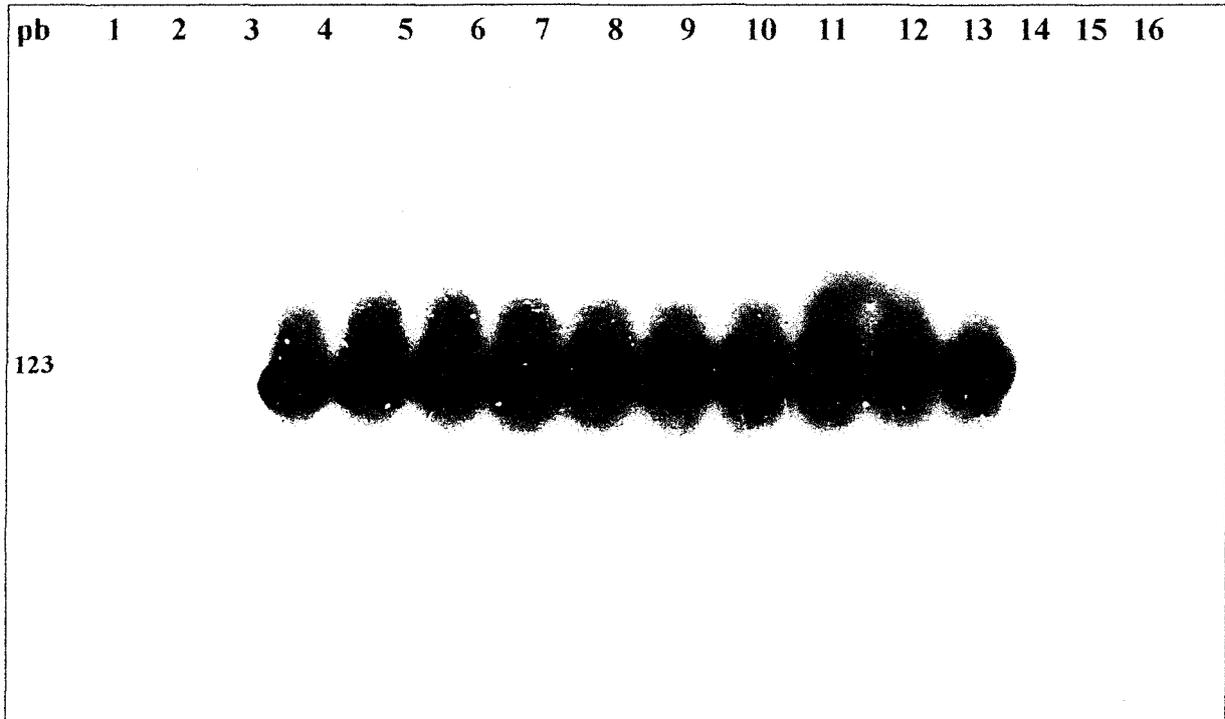
B

**FIGURA 3.3 Análise eletroforética de fragmentos de DNA de micobactérias amplificados com “primers” Pab e auto-radiografia após hibridização**

Os fragmentos de DNA foram obtidos por amplificação de DNA de diferentes micobactérias em reações de PCR com “primers” Pab e submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os DNAs foram transferidos do gel para membrana de náilon e hibridizados com a sonda Pab. Os DNAs foram extraídos de culturas de micobactérias. Linha 1, padrão de peso molecular. linha 2 DNA de *M. bovis* (controle positivo). Linhas 3-7, DNAs de diferentes isolados de *M. tuberculosis*. Linha 8, *M. avium*. Linha 9, *M. scrofulaceum*. Linha 10, *M. intracellulare*. Linha 11, *M. fortuitum*. Linha 12, controle negativo.

A- Eletroforese de fragmentos de DNA obtidos por PCR

B- Auto-radiografia após hibridização



**FIGURA 3.4** Análise auto-radiográfica de fragmentos de DNA de diferentes micobactérias amplificados com “primers” Rep após hibridização

Os fragmentos de DNA foram obtidos por amplificação de DNA de diferentes micobactérias em reações de PCR com “primers” Rep e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os DNAs foram transferidos do gel para a membrana de náilon e hibridizados com a sonda Rep marcada com  $^{32}\text{P}$ . Linha 1, padrão de peso molecular. Linha 2, controle negativo. Linha 3, DNA de *M. bovis* (controle positivo). Linhas 4-12, DNAs de diferentes isolados de *M. tuberculosis*. Linha 13, *M. avium*. Linha 14, *M. scrofulaceum*. Linha 15, *M. intracellulare*. Linha 16, *M. fortuitum*.

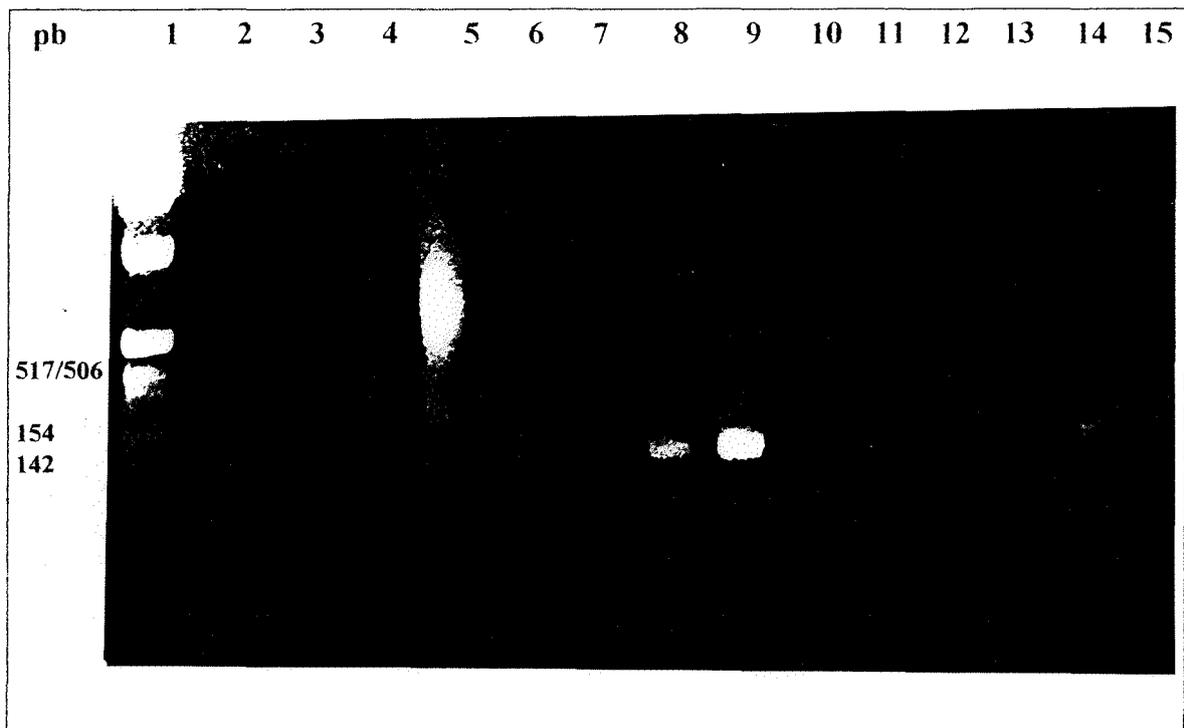
foi detectado em gel de agarose (dados não mostrados) e autoradiografia (FIGURA 3.4), somente com os DNAs de *M. tuberculosis* e *M. bovis*.

### 3.1.3 Amplificação de DNA extraído de amostras clínicas

#### 3.1.3.1 Preparação de amostras clínicas para PCR

Para determinar as condições de amplificação de DNA de *M. tuberculosis* isolados diretamente de amostras clínicas, primeiramente, foi necessário estabelecer um método adequado para a preparação da amostra para PCR. Doze amostras de escarros (8 amostras positivas e 4 negativas na baciloscopia) foram submetidas à extração de DNA pelo método “glass beads”. A reação de PCR com os “primers” Rep, nas condições padronizadas para amplificação de DNA extraído de culturas, foi realizada com os DNAs purificados das amostras clínicas. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (FIGURA 3.5). A análise do gel mostrou um fragmento de DNA de tamanho esperado em todas as amostras de escarro positivas e no DNA de *M. tuberculosis* H37RV utilizado como controle positivo e nenhum DNA era visualizado nas canaletas que possuíam reações amplificadas com as amostras de escarro negativas (FIGURA 3.5, linhas 10-13) e com água MilliQ (controle negativo). Porém, era evidente a presença de DNA inespecífico (linhas 5, 8 e 9). Os mesmos DNAs foram então amplificados com “primers” Pab. A análise do gel que continha as amostras amplificadas mostrou o fragmento de aproximadamente 520 pb em apenas 3 das 8 amostra positivas. A diferença na detecção de *M. tuberculosis* com os “primers” foi atribuída a maior sensibilidade na amplificação do IS devido a presença de um maior número de cópias no genoma. Apesar dos resultados positivos para a detecção de *M. tuberculosis* com Rep1 e 2, o método não era satisfatório para utilização em rotinas de diagnóstico por ser bastante trabalhoso e demorado.

Vinte e cinco amostras de escarros positivas na baciloscopia foram então tratadas pelo método que utilizava fervura para lise celular e tratamento com fenol/clorofórmio para purificar o DNA (NOLTE *et al.*, 1993). A análise eletroforética dos produtos de PCR amplificados em gel de agarose 1,5% mostraram



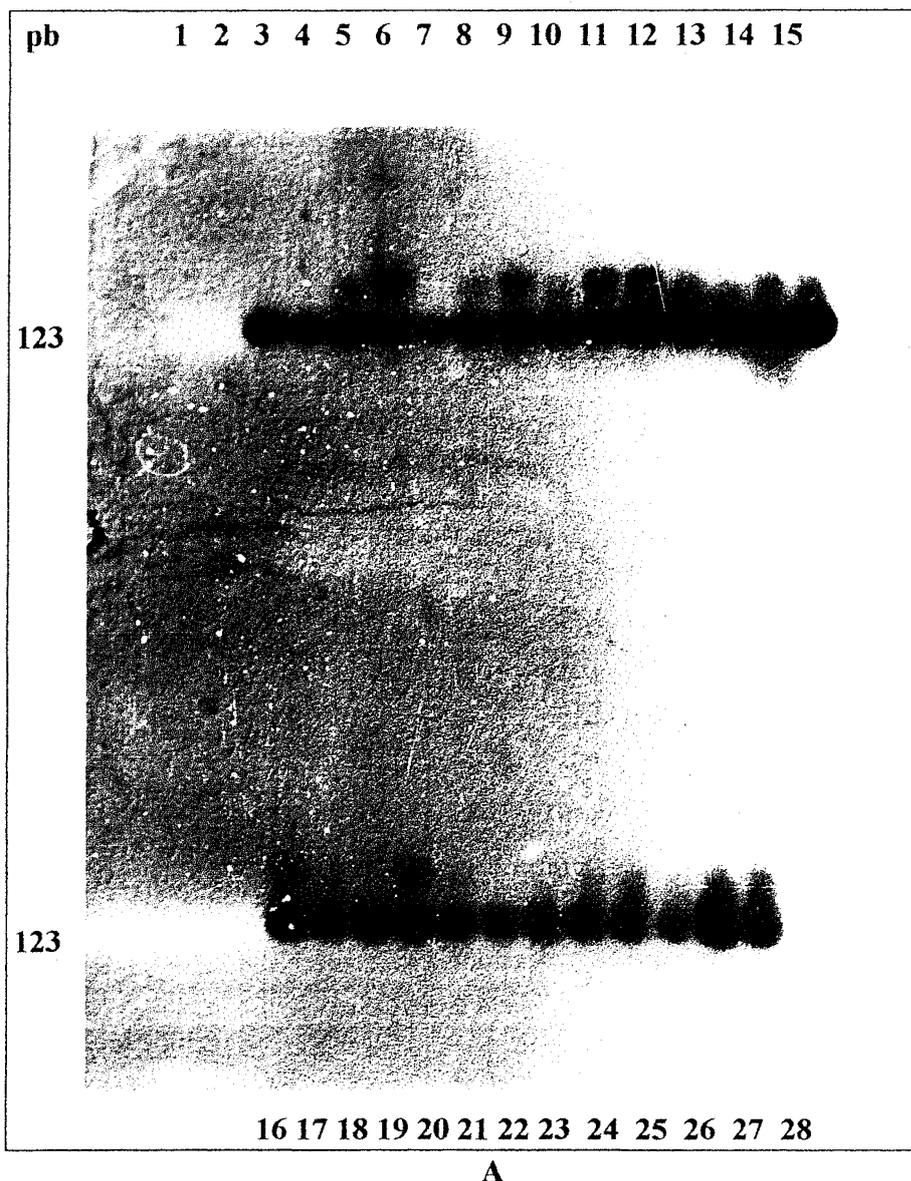
**FIGURA 3.5** Análise eletroforética de produtos de PCR amplificados a partir de amostras de escarro

Os produtos de PCR foram obtidos por amplificação de amostras de escarro tratadas com o método de “glass beads” (2.8.1.1) e “primers” Rep. As letras correspondem as amostras de escarro de pacientes diferentes. Linha 1, padrão de peso molecular. Linhas 2-9, amostras de escarro amplificadas positivas na baciloscopia. Linhas 10-13, amostras de escarro, negativas na baciloscopia. Linha 14, controle negativo. Linha 15, DNA de *M. tuberculosis* (controle positivo).

um fragmento de DNA (123 pb) pouco nítido em apenas 5 das amostras, quando a amplificação era feita com os “primers” Reps. Nenhum fragmento de DNA foi visualizado com os produtos de PCR obtidos com os “primers” Pab (dados não apresentados). Uma análise por “Southern blotting” foi então realizada utilizando-se as respectivas sondas (Pab e Rep) marcadas com  $^{32}\text{P}$ . A autoradiografia evidenciava a presença do fragmento de 123 pb em todas as amostras amplificadas com “primers” Rep (FIGURA 3.6A). O fragmento de 520 pb podia ser detectado em 19 das 25 amostras amplificadas com “primers” Pab (FIGURA 3.6B). Um fragmento de DNA menor (aproximadamente 400 pb) também foi visualizado na autoradiografia. A presença deste fragmento sugere uma homologia dos “primers” Pab em outra região do gene. A baixa sensibilidade na detecção de *M. tuberculosis* nas condições de amplificação padronizadas com ambos os “primers”, possivelmente, poderia ser atribuída a perdas de DNA durante a extração com fenol/clorofórmio.

O protocolo proposto por KOCAGÖZ *et al.* (1993) foi então usado para preparar 12 amostras de escarros positivas na baciloscopia. O método consistia em ferver as amostras para liberar o DNA e amplificá-las a seguir sem qualquer tratamento de purificação do DNA, evitando assim a diminuição da concentração. As amostras foram amplificadas somente com os “primers” Reps, escolhidos por apresentarem até então uma maior sensibilidade. Após a amplificação as amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% e após Southern blotting a membrana foi hibridizada com sonda Rep marcada com  $^{32}\text{P}$ . Uma banda de 123 pb era visível tanto no gel como na autoradiografia (FIGURA 3.7). Amplificações inespecíficas e difusas também estavam presentes em todas as canaletas. Em 6 amostras (canaletas 2-5, 7,8,13 e 14) foi possível visualizar um fragmento adicional de aproximadamente 500pb (FIGURA 3.7B) e no controle positivo houve a amplificação de vários fragmentos maiores que o de 123 pb.

Uma análise do resultado das amplificações obtidas com este protocolo evidenciou que, apesar do nível de amplificação ser satisfatório, ainda era necessária a purificação do DNA com o objetivo de obter amplificações mais nítidas (sem amplificações inespecíficas). Assim, uma etapa de purificação de DNA com pó de

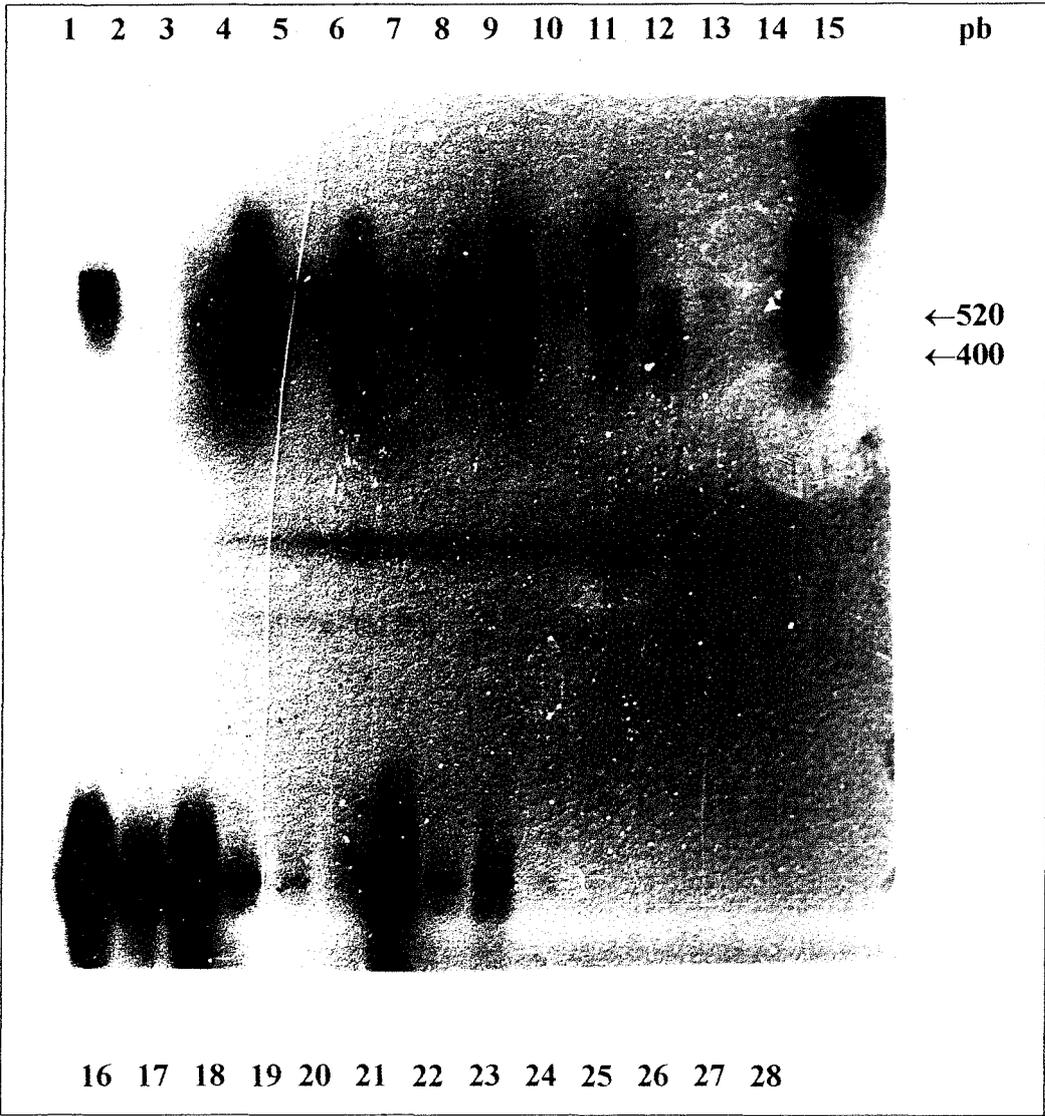


**FIGURA 3.6 Auto-radiografia de produtos de PCR amplificados a partir de amostras de escarro**

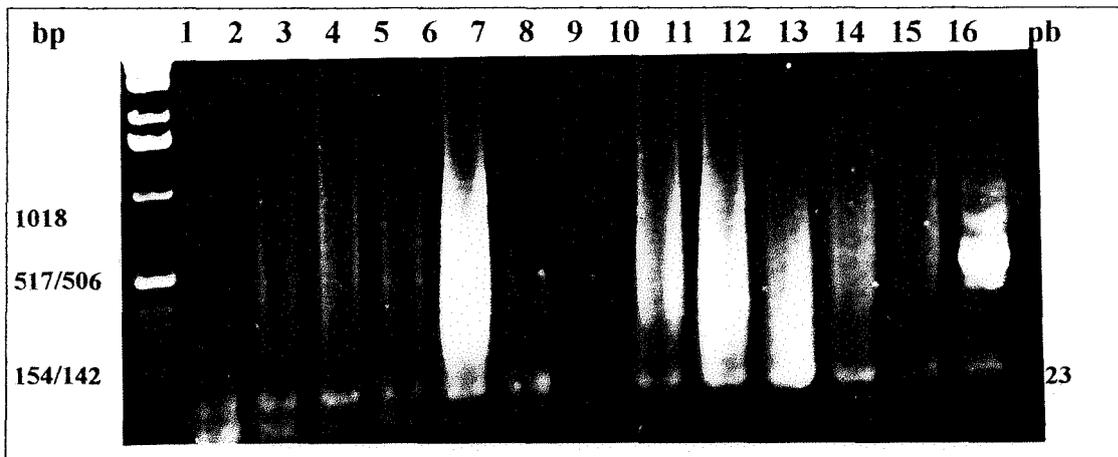
Os produtos de PCR foram obtidos por amplificação de amostras de escarro tratadas com fenol/clorofórmio e “primers” Rep e Pab. Os fragmentos de DNA gerados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e transferidos para membrana de náilon e hibridizados com sonda Rep ou Pab marcada com  $^{32}\text{P}$ . Linha 1, padrão de peso molecular. Linha 2, DNA de *M. tuberculosis* (controle positivo). Linhas 3-27, amostras de escarro tratadas e amplificadas. Linha 28, controle negativo.

A-Auto-radiografia de fragmentos de DNA amplificados com “primers” Rep e hibridizados com sonda Rep.

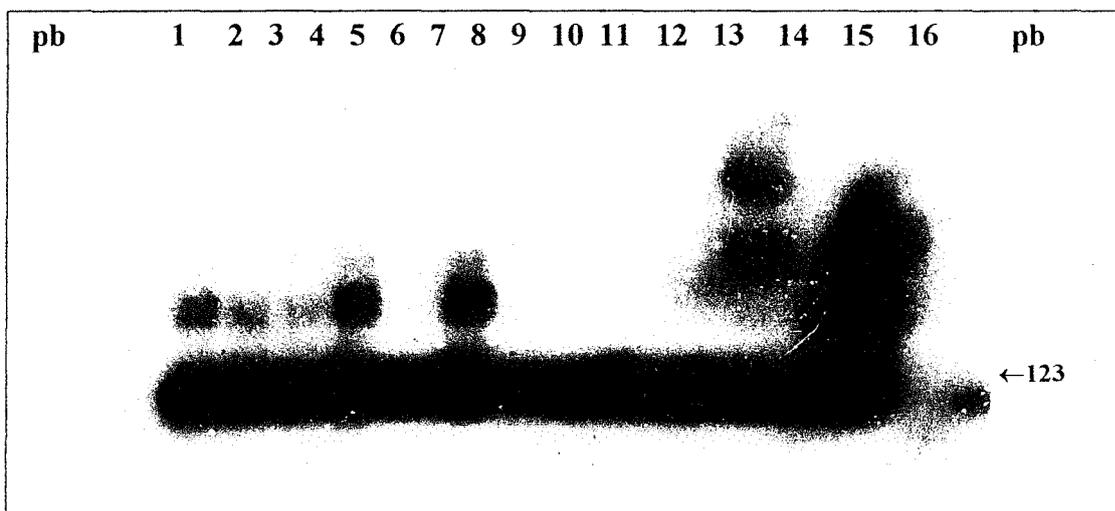
B- Auto-radiografia de fragmentos de DNA amplificados com “primers” Pab e hibridizados com sonda Pab.



B



A



B

**FIGURA 3.7 Análise eletroforética de fragmentos de DNA obtidos por amplificação de amostras de escarro e auto-radiografia dos fragmentos após hibridização**

Os fragmentos de DNA obtidos por amplificação de amostras de escarro tratadas por fervura e “primers” Rep foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos de DNA foram transferidos de gel para membrana de náilon e hibridizados com sonda Rep marcada com  $^{32}\text{P}$ . Linha 1, padrão de peso molecular. Linhas 2-13, amostras de escarro tratadas e amplificadas, provenientes de pacientes diferentes. Linha 14, amostra de escarro, positiva por PCR em testes anteriores (controle positivo de extração de DNA). Linha 15, controle negativo. Linha 16, fragmento Rep purificado.

A- Eletroforese dos fragmentos de PCR

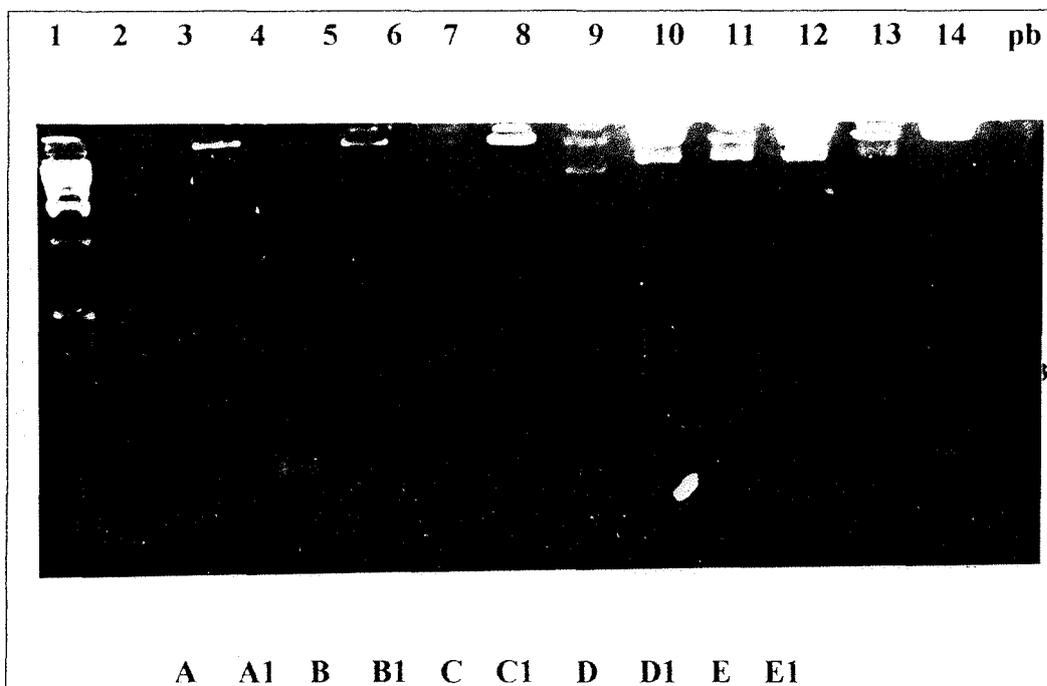
B- Auto-radiografia dos fragmentos de PCR após hibridização.

vidro foi incluída no método de preparação da amostra. As minúsculas partículas de vidro têm a propriedade de ligar o DNA, permitindo o seu isolamento de restos celulares e outras substâncias. Para verificar a eficiência da inclusão desta etapa, amostras de escarros (positivas para a presença do bacilo da TB na baciloscopia e nos testes culturais) foram processadas e as bactérias rompidas por fervura. Após centrifugação a amostra foi dividida em duas alíquotas. Uma alíquota de cada preparação era submetida a purificação com pó de vidro antes da etapa de amplificação. 30 µl de amostra (purificada e sem purificação) foi amplificada nas condições estabelecidas e com “primers” Reps.

A análise do gel de agarose demonstrou que das 5 amostras amplificadas pelos 2 protocolos, 1 delas era possível visualizar a banda de 123 pb nas duas alíquotas (amostras C e C1), em outras 3 amostras a banda só foi detectada na alíquota purificada com o pó de vidro (amostras A1, D1 e E1) e em 1 amostra a banda de 123 pb não estava presente em nenhuma das alíquotas (FIGURA 3.8).

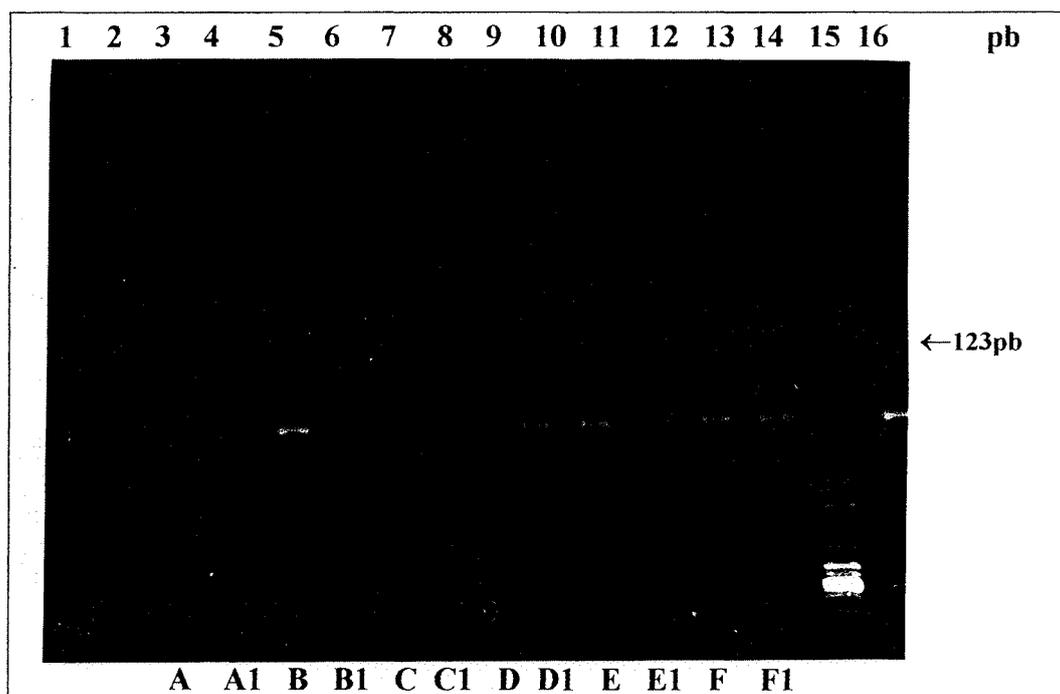
#### 3.1.4 Amplificação de DNA de *M. tuberculosis* em amostras clínicas usando pó de vidro

Com o objetivo de estabelecer a eficiência do protocolo que incluía a etapa de purificação de DNA com pó de vidro, foram analisadas 130 amostras (escarro, urina, líquido, sangue, soro) de 100 pacientes para a presença de *M. tuberculosis* por amplificação. Após a liberação do DNA por fervura, cada amostra foi dividida em duas alíquotas. Uma alíquota foi utilizada diretamente no PCR e na outra alíquota o DNA era purificado com pó de vidro antes da reação de PCR. Os resultados de PCR, ZN e cultura estão apresentados na tabela 3.1. Em geral a detecção de *M. tuberculosis* por PCR era mais eficiente com o DNA tratado com pó de vidro. Isso foi melhor observado com amostras de escarro e sangue. Vinte das 46 amostras de escarro foram positivas no PCR quando o DNA não era purificado. Depois da purificação do DNA, 37 das amostras foram positivas. Foi possível detectar DNA de *M. tuberculosis* em 8 das 9 amostras de sangue quando o DNA era purificado com pó



**FIGURA 3.8 Análise eletroforética de produtos de PCR obtidos por amplificação de amostras de escarro tratadas por fervura e pó de vidro**

Os produtos de PCR obtidos pela amplificação de amostras de escarro tratadas por fervura e pó de vidro e “primers” Rep foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. As letras correspondem às amostras de escarro tratadas. Cada amostra foi tratada por ambos os métodos. Linha 1, padrão de peso molecular. Linha 2, DNA de *M. tuberculosis* (controle positivo). Linhas 3,5,7,9,11, amostras amplificadas após serem tratadas por fervura. Linhas 4,6,8,10,12, amostras amplificadas após serem tratadas com pó de vidro. Linha 13, amostra de escarro, previamente positiva (controle de extração com pó de vidro). Linha 14, controle negativo.



**FIGURA 3.9** Análise eletroforética de produtos de PCR obtidos por amplificação de amostras de sangue e soro

Os produtos de PCR obtidos pela amplificação de amostras de sangue e soro foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. Todo o procedimento utilizado desde o tratamento da amostra com pó de vidro, condições de amplificação e detecção dos produtos eram as estabelecidas para as amostras clínicas. As letras correspondem às amostras (letras iguais representam amostras do mesmo paciente). As letras acompanhadas com número 1 correspondem as amostras de soro. Linha 1, DNA de *M. tuberculosis* (controle positivo). Linha 2, padrão de peso molecular. Linhas 3-12, amostras de sangue e soro amplificadas de pacientes com TB. Linhas 13 e 14, amostras de soro de pacientes sem diagnóstico de TB. Linha 15, soro com PCR positivo (controle de extração). Linha 16, controle negativo.

de vidro. Quando as amostras de sangue eram só fervidas, o número de positivas no PCR era 4. A FIGURA 3.9 mostra a análise eletroforética do produto amplificado a partir de DNA de amostras de sangue e soro tratadas com pó de vidro. O objetivo desta análise era verificar a eficiência de amplificação. A diferença na visualização não era significativa, portanto, o soro poderia ser utilizado para amplificação, substituindo o sangue, que livre de componentes como a hemoglobina, possibilita uma melhor purificação do DNA.

### 3.1.5 Sensibilidade do método de PCR estabelecido para a detecção de *M. tuberculosis*

Para determinar o limite de detecção do método de PCR estabelecido em amostras clínicas, um pool de soro, um "pool", de escarro, líquor e TE (controle), foram contaminados com *M. tuberculosis*. O DNA foi extraído das amostras pelo método de pó de vidro e amplificado com os "primers" Repts. O limite de detecção dos fragmentos de DNAs amplificados em gel de agarose corado com brometo de etídio foi de 10 UFC em soro, líquor e TE (controle). Em amostras de escarro o limite de detecção foi de 50 UFC.

### 3.1.6 Utilidade clínica do protocolo estabelecido no diagnóstico de TB

O protocolo para o diagnóstico de TB por PCR após ter sido estabelecido, foi utilizado para analisar 179 amostras de pacientes suspeitos de TB que ingressaram na rotina do serviço de bacteriologia do LACEN durante o ano de 1994 e 1995. Com todas as amostras que tinham um volume suficiente foi realizado testes de cultura. Os resultados obtidos por PCR e por testes de cultura, comparados com o diagnóstico clínico do paciente estão apresentados na tabela 3.2.

Escarro: Das 39 amostras de escarro, 25 foram positivas no teste de PCR. Dessas, 19 foram positivas e 6 (duas de cada paciente) foram negativas em cultura. Todas as amostras positivas por PCR derivavam de pacientes com diagnóstico de TB pulmonar. Das 14 amostras negativas por PCR, 10 foram negativas e 4 positivas em cultura. Duas das amostras positivas em cultura foram identificadas como *M. avium* e duas como *M. tuberculosis*.

Lavado brônquio-alveolar (LBA): 26 amostras de LBA foram analisadas. Dessas, 6 amostras foram positivas na análise por PCR. Três dessas foram positivas na cultura,

2 foram negativas e as outras amostras não foram testadas. Esses pacientes receberam tratamento para TB. Das 20 amostras que foram negativas por PCR, 19 foram também negativas em cultura e uma não foi testada.

Líquor: Foram analisadas 54 amostras de líquido. Dessas, somente 3 foram positivas por PCR e em cultura. Onze amostras foram positivas por PCR e negativas em cultura. Essas amostras foram de 10 pacientes tratados para TB e de 1 não tivemos informação. Das 40 amostras negativas por PCR, 39 foram também negativas em testes de cultura. Em uma das amostras, a cultura não foi realizada.

Sangue: Seis amostras de sangue foram analisadas. Quatro delas foram positivas por PCR. Dessas, somente 1 foi positiva em cultura. Duas amostras negativas nos testes de cultura pertenciam a pacientes com TB pulmonar (eles tinham resultado positivo em cultura do escarro). Os outros 2 pacientes com amostra de sangue positivo por PCR foi tratado para TB.

Soro: Trinta e sete amostras de soro foram também analisadas. Vinte e uma foram positivas por PCR. Dessas, 19 foram negativas em testes de cultura e duas não foram testadas. Todos os pacientes com amostras positivas por PCR tiveram diagnóstico de TB pulmonar ou extrapulmonar. Esses pacientes eram aidéticos com resultados positivos em cultura do escarro, urina ou fezes. Nenhuma informação foi obtida sobre as culturas das outras duas amostras de soro positivo no PCR. No entanto, esses pacientes receberam tratamento para TB com base no diagnóstico clínico. 16 amostras negativas por PCR também foram negativas em testes de cultura.

Serosas: Das 9 amostras de líquido pleural analisadas, 3 foram positivas por PCR e cultura, duas foram positivas somente por PCR. Das 4 amostras que foram negativas por PCR, 3 foram também negativas em cultura e uma não foi testada. A única amostra de fluido pericárdico analisada foi positiva em ambos os testes. As amostras de fluido ascítico analisadas foram positivas por PCR. Dessas, uma era positiva e a outra negativa em cultura (a amostra pertencia a um paciente que recebia tratamento para TB).

**TABELA 3.1 Detecção por PCR de *M. tuberculosis* em amostras clínicas antes e depois do tratamento com pó de vidro**

Amostra	Nº de amostra	cultura positiva	ZN positivo	PCR positiva	
				Antes PV	Depois PV
<b>1.Grupo de pacientes com diagnóstico de TB</b>					
Escarro	46	39	27	20	37
Urina	3	2	0	0	2
Líquor	3	1	0	1	2
Sangue <sup>a</sup>	9	1	0	4	8
<sup>a</sup> Soro <sup>a</sup>	9	0	0	8	9
Total	70	43	27	33	58
<b>2.Grupo de pacientes sem suspeita de TB</b>					
Urina	5	0	n.t.	0	0
Líquor	13	0	n.t.	0	0
Sangue	21	0	n.t.	0	0
Soro	21	0	n.t.	0	0
Total	60	0		0	0

PV= Pó de vidro ZN = Ziehl-Neelsen PCR = Polymerase Chain Reaction

<sup>a</sup>As amostras de soro e sangue eram do mesmo paciente com diagnóstico prévio de TB pulmonar e cultura positiva de escarro.

n.t. =não testados

**TABELA 3. 2 Comparação entre os resultados de PCR, teste de cultura e diagnóstico clínico do paciente**

Amostra	Nº de amostras	PCR		Cultura			Diagnostico de TB		
		pos	neg	pos	neg	n.t.	pos	neg	n.c.
<b>Escarro</b>	39	<b>25</b>		<b>19</b>			<b>19</b>		
				6			6		
			14	10			0	9	1
				4			2	2	
<b>LBA</b>	26	<b>6</b>		<b>3</b>			<b>3</b>		
				2			2		
					1		1		
			20	19				12	7
					1				1
<b>Líquor</b>	54	<b>14</b>		<b>3</b>			<b>3</b>		
				11			10		1
			40	39	1			40	
<b>Sangue</b>	6	<b>4</b>		<b>1</b>	<b>3</b>		<b>4</b>		
			2	2			1		1
<b>Soro</b>	37	<b>21</b>		<b>19</b>	<b>2</b>		<b>21</b>		
			16	16				12	4
<b>Líquido pleural</b>	9	<b>5</b>		<b>3</b>			<b>3</b>		
				2				1	1
			4	3	1		4		
<b>Líquido ascítico</b>	2	<b>2</b>		<b>1</b>			<b>2</b>		
				1					
<b>Líquido pericárdico</b>	1	<b>1</b>		<b>1</b>			<b>1</b>		
<b>Urina</b>	5	<b>2</b>		<b>2</b>			<b>2</b>		
			3	3				1	2

n.t. - não testado

n.c. - não conhecido

Os números de amostras que foram positivos no PCR são indicados em negrito.

Urina: Cinco amostras de urina foram analisadas. Duas delas foram positivas por PCR e cultura e 3 foram negativas em ambos os testes.

Para comparar a sensibilidade e especificidade dos testes de cultura com o método por PCR estabelecido que utiliza pó de vidro para purificação do DNA a ser amplificado nós analisamos os resultados confirmados apresentados na tabela 2. As amostras sem resultados de cultura ou de diagnóstico clínico não foram consideradas na análise. Os resultados mostraram que o método descrito neste trabalho apresentou uma maior sensibilidade e especificidade que os testes de cultura (TABELA 3.3). A diferença na sensibilidade entre ambos os testes é principalmente devido a baixa sensibilidade dos testes de cultura em líquido, soro e sangue, que correspondem a aproximadamente 55,7% do número de amostras com diagnóstico de TB.

**TABELA 3.3 Comparação de sensibilidade e especificidade dos testes de PCR com pó de vidro e de cultura nos resultados confirmados**

Tipo de teste e resultado	Número de resultados confirmados		Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
	Positivo	Negativo		
<b>Cultura</b>				
Positiva	35	2	45,5	97,5
Negativa	42	79		
<b>PCR</b>				
Positivo	75	1	97,4	98
Negativo	2	80		

### 3.2 Caracterização de Isolados de *M. tuberculosis*

As técnicas de RFLP e “spoligotyping” foram utilizadas para caracterizar os isolados de *M. tuberculosis* provenientes do Estado do Rio Grande do Sul. Os resultados obtidos por ambas as técnicas foram comparados.

#### 3.2.1 Detecção de polimorfismo de DNA nos isolados de *M. tuberculosis* por RFLP

A técnica de RFLP baseada nos elementos de inserção IS6110 e IS1081 foi utilizada na análise de isolados de *M. tuberculosis*.

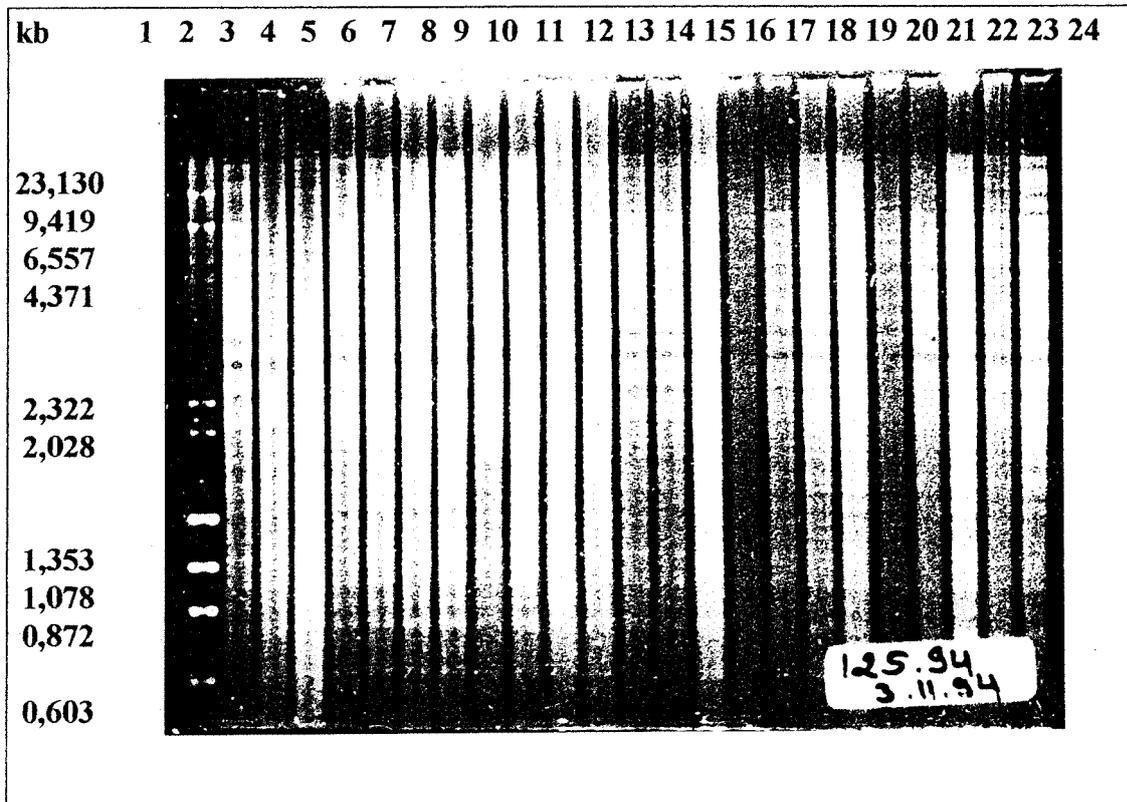
### 3.2.1.1 Padrão de clivagem dos DNAs extraídos com *PvuII*

O DNA de cada um dos isolados de *M. tuberculosis* foi clivado com a endonuclease de restrição *PvuII* e os produtos de clivagem foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Das 127 amostras de DNAs de *M. tuberculosis* clivados, somente 81 amostras mostraram um padrão de clivagem total e sem clivagens inespecíficas. O padrão eletroforético em gel de agarose de 21 DNAs digeridos com *PvuII* pode ser visualizado na FIGURA 3.10. Os fragmentos de DNA, produtos de clivagem, foram então transferidos para membranas de náilon pela técnica de Southern.

### 3.2.1.2 Análise dos padrões de bandas obtidos por RFLP

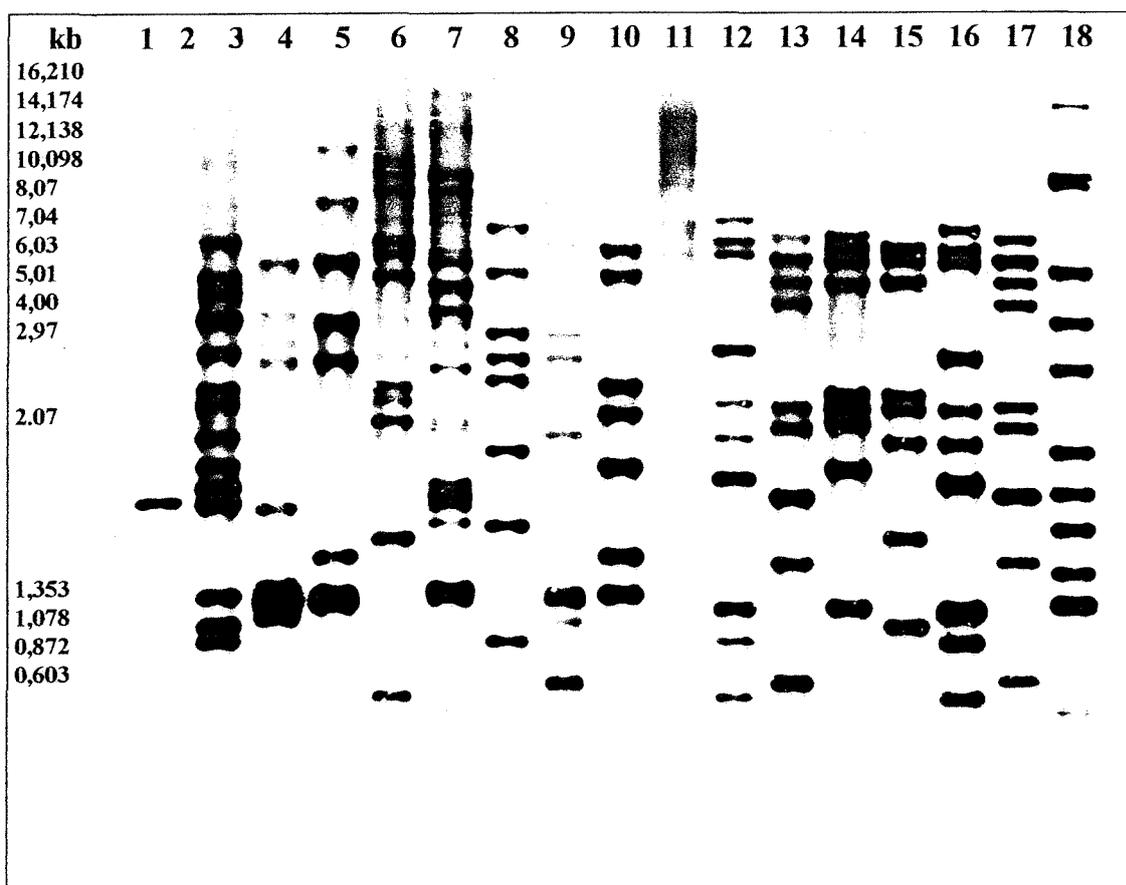
Os padrões de RFLP de 81 isolados de *M. tuberculosis* foram analisados e comparados. A análise evidenciou um alto grau de polimorfismo entre os isolados quando o IS6110 foi usado como sonda e um limitado grau de polimorfismo com a sonda derivada de IS1081. A variabilidade de padrões encontrada nesta região era devido aos tamanhos e números de bandas de hibridização. O número de bandas representa o número de cópias de IS6110 e IS1081 e o tamanho indica a posição diferente do elemento no genoma dos isolados. O número de cópias de IS1081 variou de 5 a 6. O número de cópias de IS6110 dos isolados variou de 2 a 18.

Na FIGURA 3.11 é possível visualizar os distintos padrões de RFLP de 15 amostras de DNA de isolados diferentes de *M. tuberculosis*. A membrana contendo essas amostras foi hibridizada primeiramente com a sonda IS6110 marcada com peroxidase (2.13.2) gerando os padrões de RFLP-IS6110 (FIGURA 3.11A). Após retirada da sonda, a membrana foi hibridizada com a sonda IS1081 obtendo-se então os padrões de RFLP-IS1081 (FIGURA 3.11B). Posteriormente, a mesma membrana



**FIGURA 3.10** Análise eletroforética em gel de agarose de DNA cromossomal de micobactérias clivado com *PvuII*

Os DNAs extraídos e clivados com *PvuII* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%. Posteriormente, foram transferidos para membrana de náilon. Linha 1, padrão de peso molecular (mistura de DNA lambda-*HindIII* e PhiX174-*HaeIII*) conforme descrito em 2.19.1.3. Linha 2, DNA de *M. bovis* BCG. Linha 3-23, DNA de *M. tuberculosis* isolados de pacientes diferentes. Linha 24, DNA de *M. tuberculosis* linhagem 14324 (controle do procedimento).



A

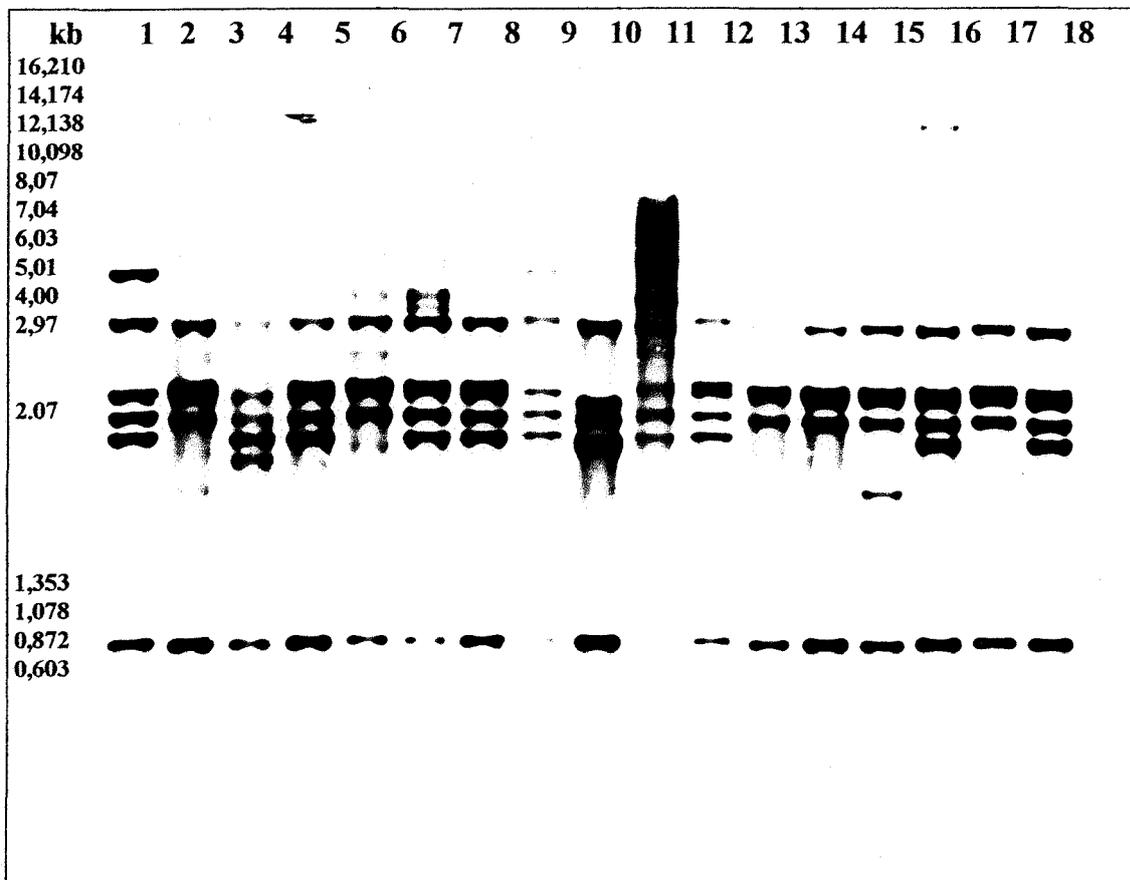
**FIGURA 3.11 Auto-radiografia dos DNAs de micobactérias obtida após hibridização com sonda IS6110, IS1081 e marcador interno**

DNA cromossomal foi digerido com *PvuII* e após eletroforese em gel de agarose (FIGURA 3.10) foi transferido para membrana de náilon. A membrana foi hidridizada com as sondas IS6110 (A), IS1081(B) e Marcador interno (C) para obtenção dos padrões de RFLP ("fingerprinting"). Os números colocados abaixo da figura representam os isolados analisados. Linha 1, padrão de peso molecular (mistura de DNA lambda-*HindIII* e PhiX174-*HaeIII*). Linha 2, DNA de *M.bovis* BCG. Linha 3-17, DNA do complexo *M. tuberculosis* extraído de culturas de amostras clínicas de pacientes diferentes. Linha 18, DNA de *M. tuberculosis* linhagem 14324 (controle do procedimento). Os números colocados à esquerda indicam o tamanho dos marcadores.

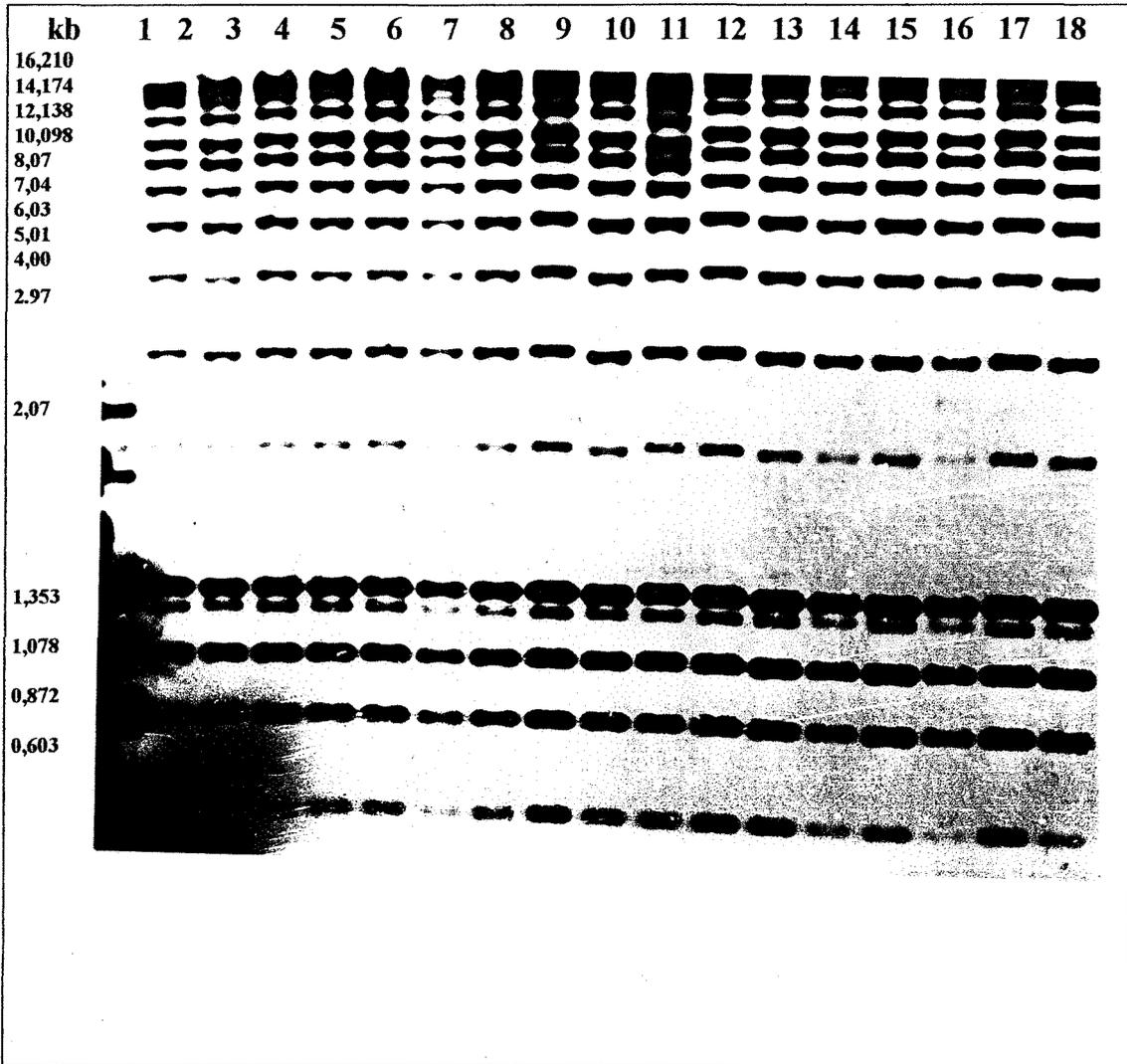
A- Padrões de RFLP obtidos após hibridização com sonda IS6110

B- Padrões de RFLP obtidos após hibridização com sonda IS1081.

C- Padrões de RFLP obtidos após hibridização com sonda de marcador interno



B

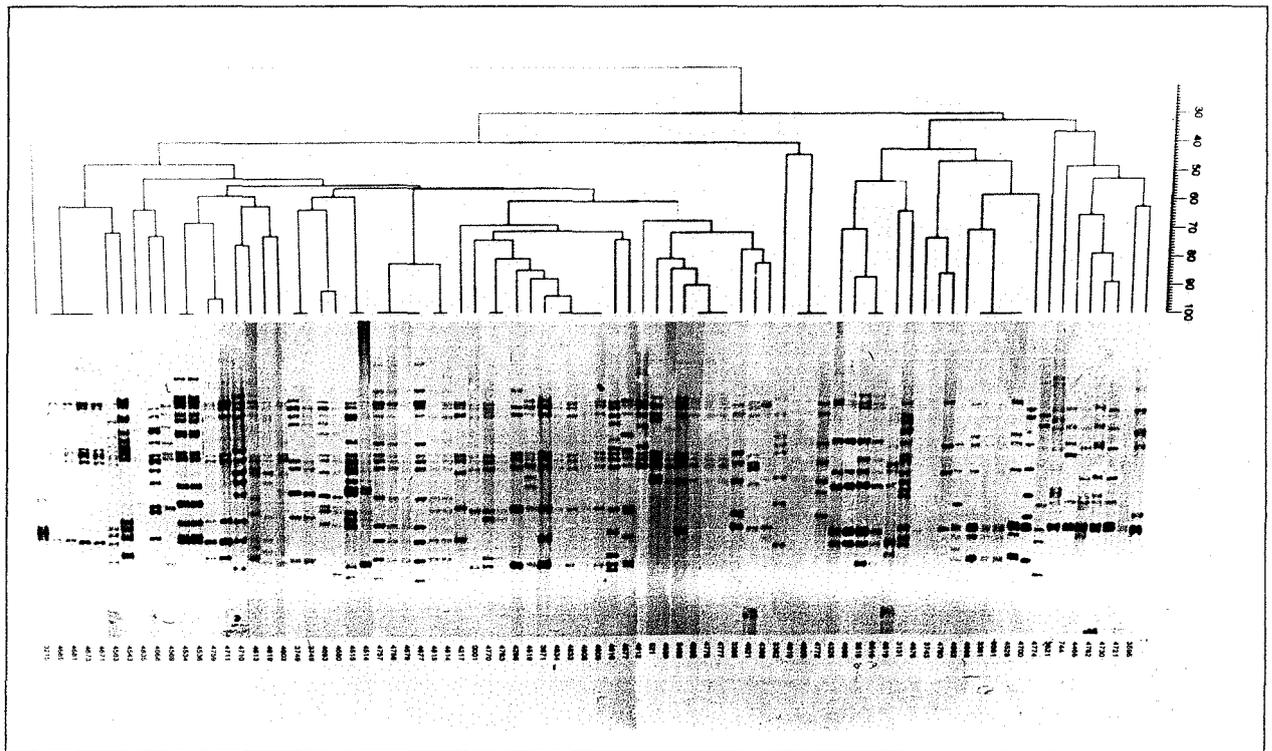


C

foi hibridizada com a sonda correspondente ao marcador interno usado para normatizar os padrões de hibridização (FIGURA 3.11C). Os padrões de RFLP obtidos com as amostras de DNA isoladas de *M. tuberculosis* 14323 e *M. bovis* BCG (linhas 18 e 2, respectivamente), usadas como controle, correspondiam ao esperado.

A análise por RFLP associada ao IS1081 de todos os 80 DNAs evidenciou somente 9 padrões de bandas diferentes, o que tornou a diferenciação dos isolados baseada no polimorfismo nesta região bastante limitada. Seis bandas diferentes contendo IS1081, localizadas próximas aos fragmentos de restrição do marcador interno (5,01; 4,00; 2,97 e 1,353 Kb) foram encontradas em quase todas as espécies (90%) (FIGURA 3.11B). O padrão de bandas diferiu apenas em uma ou duas bandas. O padrão de bandas de *M. bovis* BCG tinha como característica a presença do fragmento de restrição de 8,0 kb. Este fragmento foi encontrado em apenas um isolado (amostra 3381). Esta amostra considerada pertencente ao complexo *M. tuberculosis* pelos testes bioquímicos, poderia ser caracterizada como *M. bovis* BCG pelo RFLP obtido.

Devido ao maior número de cópias de IS6110, os padrões foram analisados em computador quanto a similaridade. Esta comparação está representada na FIGURA 3.12. Somente 3 isolados apresentaram 4 cópias ou menos, todos os outros carregavam 7 ou mais cópias do elemento, representando 96% dos isolados analisados. Nenhuma correlação foi encontrada entre o número de cópias e as características de resistência a fármacos. A análise por RFLP associada ao IS6110 permitiu identificar 57 padrões distintos de bandas nos 80 isolados. Trinta e seis isolados ficaram divididos em 13 grupos. Esses grupos possuíam padrão de RFLP idênticos e o número de pacientes por grupo variava de 1 a 3. Em 3 grupos havia pacientes com RFLP idênticos que não provinham do mesmo Centro de Saúde (grupos 1,3,13). Nos demais grupos, pacientes com RFLP idênticos pertenciam ao mesmo Centro de Saúde. Quase todos os isolados do mesmo paciente tinham RFLP idênticos (FIGURA 3.11A, linhas 12 e 16). Apenas 2 pacientes tiveram 2 isolados que diferiam em uma única banda (4680 e 4693). Esses isolados eram provenientes de escarro colhidos em dias diferentes. Nenhuma diferença fenotípica foi observada nos



**FIGURA 3.12** Padrão de bandas obtidos por RFLP de 81 DNAs de *M. tuberculosis* isolados na Rio Grande do Sul

Os padrões de banda obtidos por RFLP/IS6110 foram ordenados por similaridade em computador utilizando o programa Gelcompar. As bandas de todas as linhas puderam ser comparadas devido a normatização da posição dos fragmentos de restrição. Os números colocados abaixo da figura representam os isolados analisados no período de 1993 e 1994.

testes de cultura. Os isolados 3493, 4539 (de pacientes diferentes) apresentavam uma única banda diferencial dos isolados 4777, 4778. O isolado 3493 foi resistente a isoniazida no antibiograma. O isolado 4893 também diferia do 4680 apenas em uma banda. Os pacientes pertencentes ao mesmo grupo foram tratados no mesmo Centro de Saúde.

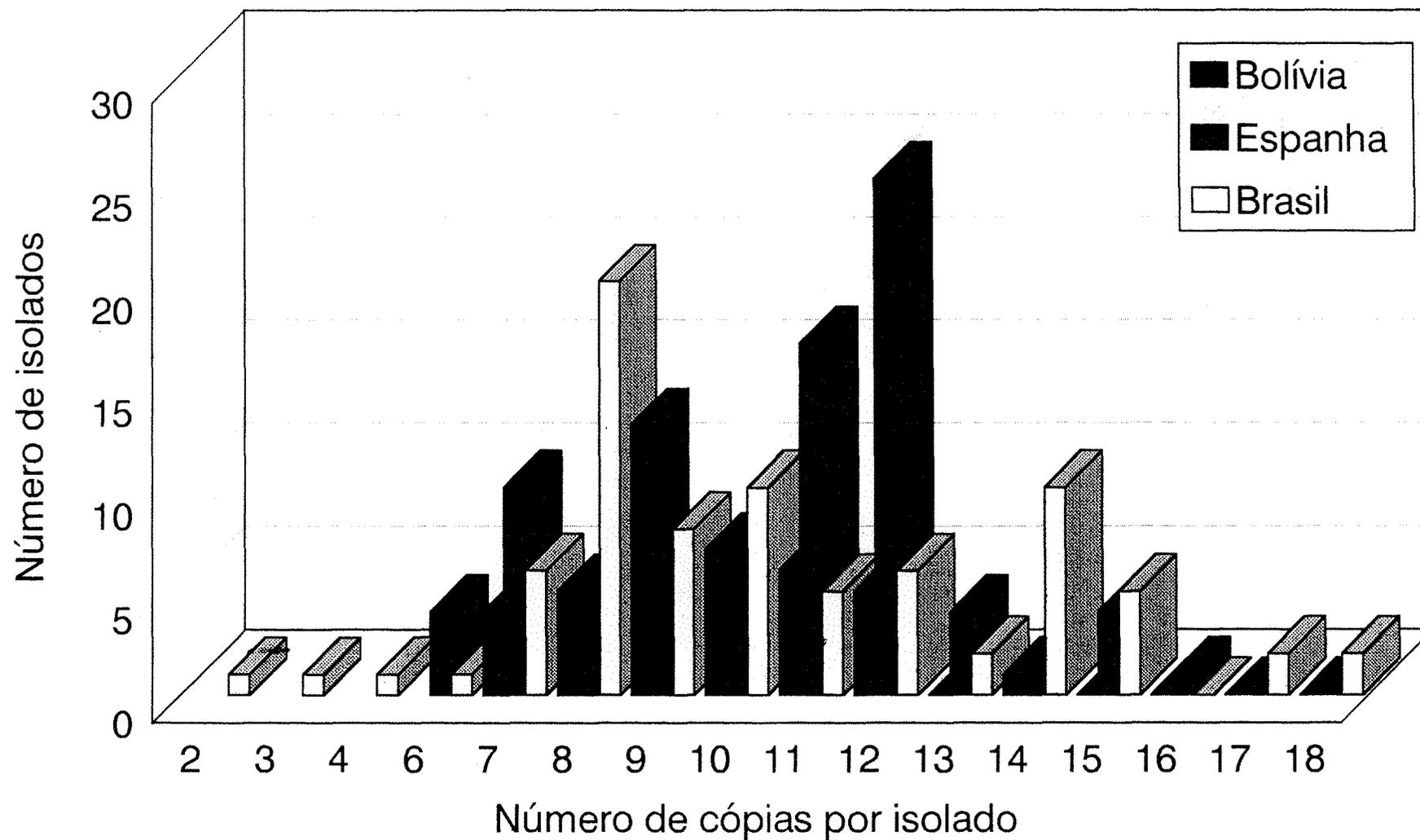
Pela análise da matriz de similaridade dos padrões de RFLP dos DNAs de todos os isolados (FIGURA 3.13) foi evidenciado que, apesar da grande diversidade dos padrões encontrados, existe um alto nível de correlação entre os isolados no Estado. Trinta e cinco dos 80 DNAs analisados (44%) compartilhavam 65% dos fragmentos de IS. Este grupo (grande grupo) era composto de pacientes que estavam sendo tratados para TB pela primeira vez (25) e pacientes crônicos (10). Somente um dos pacientes era de uma cidade do interior do Estado, os outros eram da capital.

A comparação do número de cópias de IS6110 desses isolados com os de outros países (Índia, África do Sul, Zâmbia, Coreia do Sul, Etiópia, Bolívia, Groenlândia, Irã, Tunísia, Honduras, Mongólia, França, Tanzânia, Espanha, Chile, China) foi realizada. A distribuição do número de cópias no genoma dos isolados de *M. tuberculosis* no Rio Grande do Sul é semelhante a distribuição encontrada na maioria dos países, isto é, a maioria dos DNAs analisados possuem de 7 a 14 cópias. A FIGURA 3.14 mostra uma comparação do número de cópias encontrada no Brasil, Bolívia e Espanha. A localização do elemento IS6110 é bastante variada, existindo similaridade maiores com isolados de Zâmbia, Tunísia, África do Sul e Espanha.

### 3.2.2 Detecção de polimorfismo de DNA nos isolados de *M. tuberculosis* por “spoligotyping”

Para verificar a viabilidade da aplicação da técnica de “spoligotyping” na detecção de polimorfismo nos isolados de *M. tuberculosis* que permitisse a identificação de linhagens diferentes, foram analisados 107 dos 127 DNAs extraídos. Desses, 63 tinham sido tipificados por RFLP.





**FIGURA 3.14** Número de cópias de IS6110 no DNA de *M. tuberculosis* isolados no Rio Grande do Sul, Bolívia e Espanha

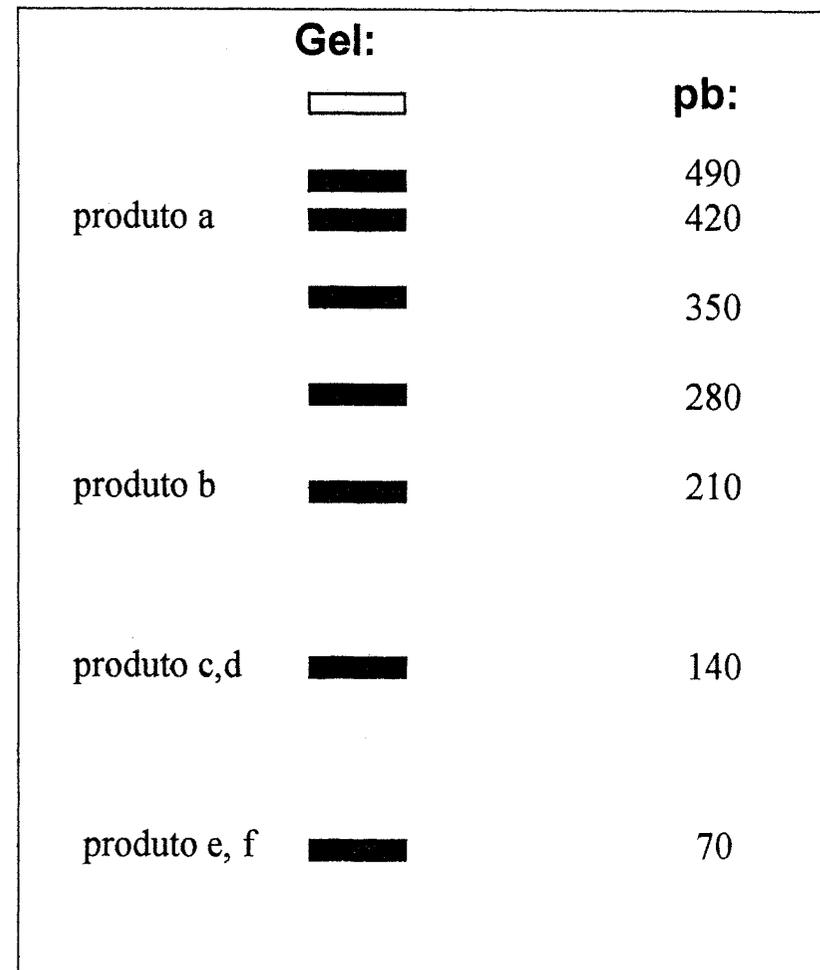
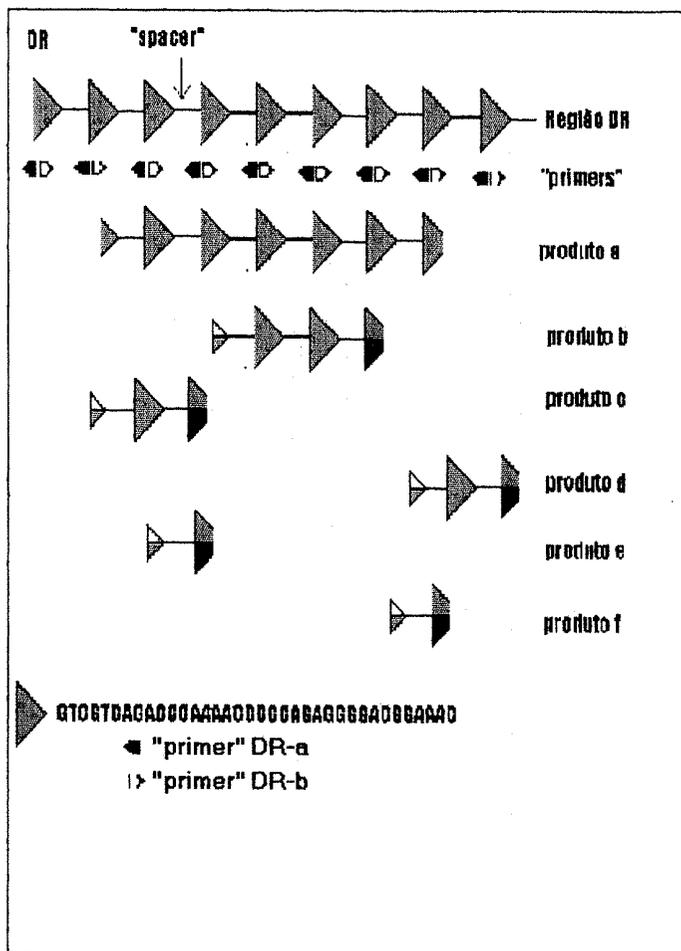
A comparação do número de cópias de IS6110 presente no genoma do complexo *M. tuberculosis* isolados no Rio Grande do Sul com de outros países foi realizada pela análise de dendograma construído em computador. Esses dendogramas constituem um banco de RFLP-IS6110 de isolados de *M. tuberculosis* provenientes de vários países.

### 3.2.2.1 Amplificação por PCR da Região DR

Uma alíquota de 10 ng de DNA extraído de culturas de diferentes isolados foi utilizado em reações de PCR para amplificar a região DR do genoma de *M. tuberculosis*. A amplificação desta região foi realizada com o objetivo de obter seqüências correspondentes aos diferentes “spacers” encontrados nos isolados. Os “primers” DR-a e DR-b utilizados anelavam nas seqüências repetitivas (DRs) da região DR, permitindo assim a amplificação dos “spacers” presentes entre as DRs (FIGURA 3.15). O “primer” reverso era biotinizado, assim, todas as fitas reversas sintetizadas durante a amplificação estavam biotinizadas. A amplificação dos DNAs produziu muitos fragmentos de tamanhos diferentes (FIGURA 3.16). Os fragmentos de DNA de tamanhos diferentes são gerados pelo fato de cada fragmento amplificado conter diferentes números de espaçadores e DRs, dependendo da localização de anelamento dos “primers” (FIGURA 3.15). Os produtos podem também atuar como um alvo e ser amplificados. Portanto, a partir dos produtos de PCR não é possível conhecer a ordem ou o tamanho total da região DR.

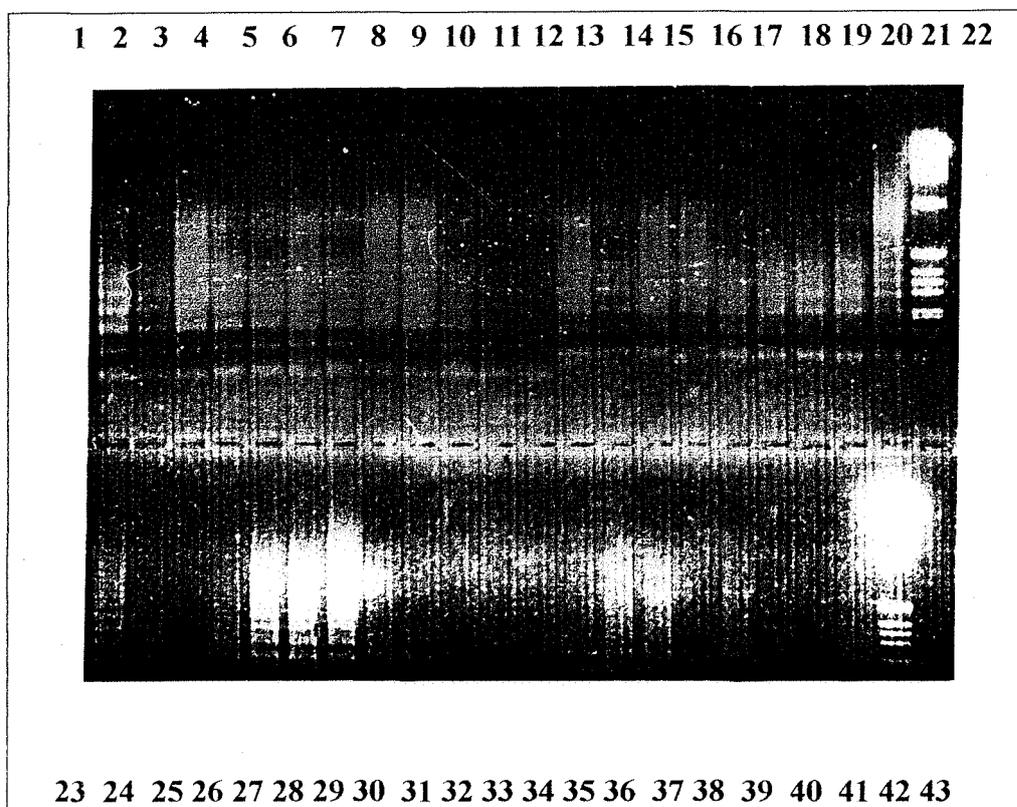
### 3.2.2.2 Detecção dos espaçadores presente nos isolados de *M. tuberculosis*

A detecção da seqüência de espaçadores amplificadas a partir dos isolados de *M. tuberculosis* foi realizada por hibridização dos produtos de PCR com uma membrana contendo os oligonucleotídeos derivados de seqüência de nucleotídeos dos “spacers” conhecidos. Após a revelação das membranas e exposição ao filme de Raio X foi possível visualizar pontos de hibridização na autoradiografia. A FIGURA 3.17 mostra a auto-radiografia obtida com 36 DNAs de diferentes isolados de *M. tuberculosis*. Cada coluna de pontos representa a hibridização dos DNAs amplificados com os diferentes oligonucleotídeos derivados dos espaçadores colocados nas linhas horizontais. Os DNAs estão colocados verticalmente enquanto que os 43 oligonucleotídeos estão na horizontal. As linhas 1, 2 e 3 correspondem a *M. bovis* BCG, água MilliQ e *M. tuberculosis* (linhagem H37Rv), respectivamente, usadas como controle.



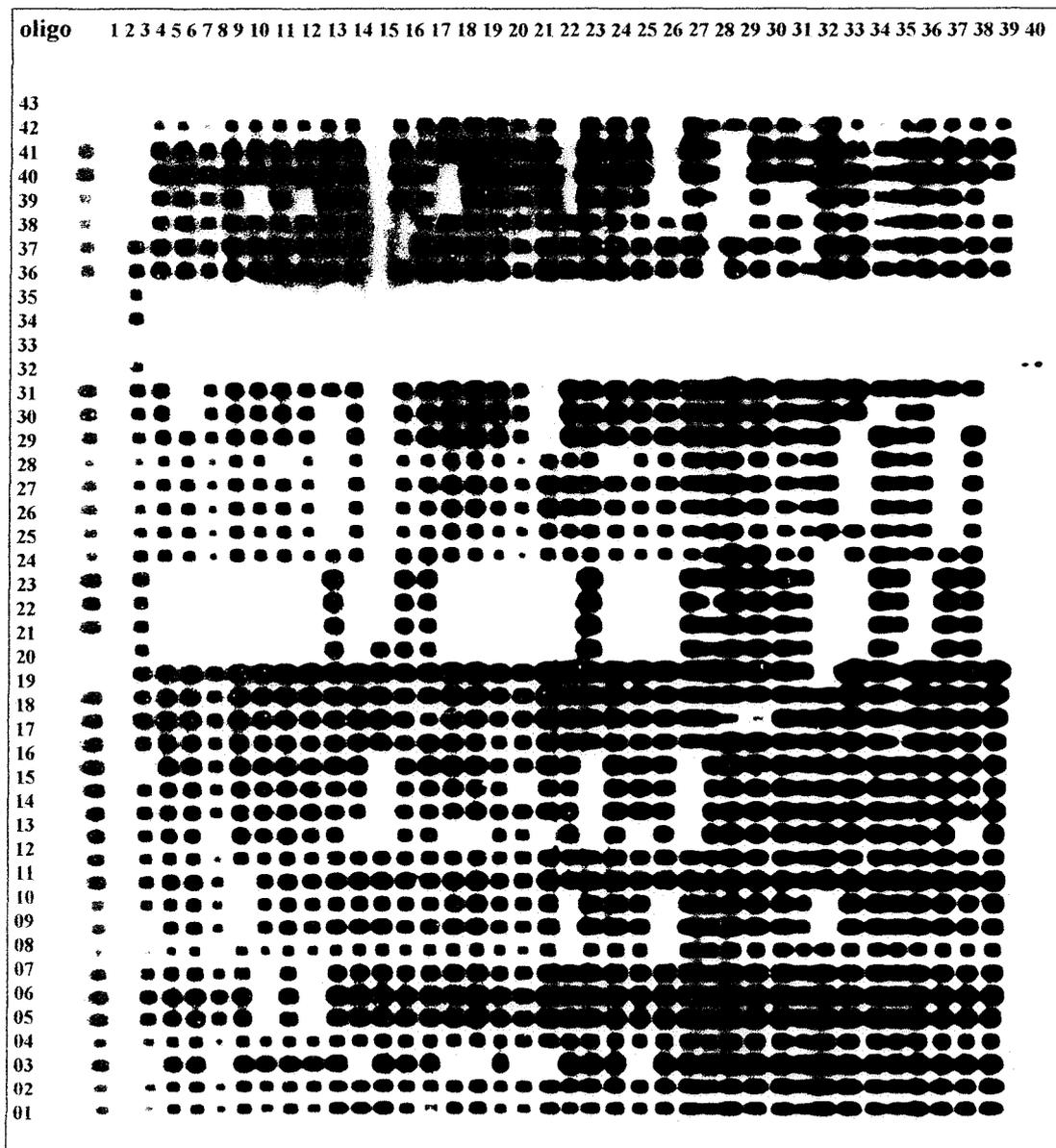
**FIGURA 3.15** Representação esquemática do princípio de amplificação de DNA dentro da região DR do complexo *M. tuberculosis*.

A amplificação com os "primers" DR-a e DR-b geravam vários fragmentos de DNA de tamanho diferentes contendo as seqüências de "spacers" e Drs (KAMERBEEK *et al.*, submetido à publicação).



**FIGURA 3.16** Análise eletroforética em gel de agarose de produtos de PCR amplificados a partir da região DR do DNA cromossomal de micobactérias

Os produtos de PCR obtidos pela amplificação de DNA do complexo *M. tuberculosis* com "primers" DR-a e DR-b foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os DNAs foram extraídos de culturas de amostras clínicas de pacientes e amplificados nas condições descritas em 2.19.2. Linhas 22 e 43, padrão de peso molecular (DNA 1Kb ladder). Linha 1 e 2, DNA de *M. bovis* (P3) e *M. tuberculosis* (H37Rv), respectivamente (controles do procedimento). Linhas 3-21 e 23-41, DNA isolados de *M. tuberculosis* diferentes. Linha 42, H<sub>2</sub>O MilliQ (controle negativo).



**FIGURA 3.17** Auto-radiografia com os resultados de "spoligotyping"

Uma membrana com 43 oligonucleotídeos correspondendo aos "spacers" de *M. bovis* P3 e *M. tuberculosis* H37Rv foi utilizada (linha horizontal). Os produtos amplificados dos isolados de *M. tuberculosis* provenientes de amostras de pacientes foram colocados para hibridização (linha vertical). A auto-radiografia representa o padrão de hibridização de isolados do complexo *M. tuberculosis* obtidos por "spoligotyping". Linhas 1 e 3, DNA de *M. tuberculosis* (H37Rv) e DNA de *M. bovis* (P3) respectivamente (controles do procedimento). Linha 2, H<sub>2</sub>O MilliQ (controle negativo). Linhas 4-40, DNA de *M. tuberculosis* isolados de culturas de amostras clínicas provenientes de pacientes.

### 3.2.2.3 Análise dos padrões de hibridização obtidos dos isolados

A análise comparativa dos padrões de bandas de hibridização obtidos dos isolados de *M. tuberculosis* por “spoligotyping” evidenciou 48 “spoligotypes” diferentes. Nenhum isolado mostrava sinal de hibridização com os espaçadores 33, 34, 35 e 36. Somente *M. bovis* BCG (controle) apresentou hibridização com esses espaçadores. De acordo com os padrões gerados, os isolados analisados podiam ser divididos em 20 grupos diferentes. Cada grupo era constituído por isolados pertencentes a 2 ou mais pacientes. Amostras do mesmo paciente apresentavam o mesmo padrão, o que demonstrava uma boa reprodutibilidade do método. Ainda, foi possível identificar a existência de características comuns, como a não hibridização com os espaçadores 21, 22, 23 e 24 na maioria dos isolados (55%), conferindo uma similaridade de 90%. Dois isolados não apresentavam hibridização com nenhum espaçador. Vinte isolados apresentaram hibridização com a maioria dos “spacers”.

### 3.2.3 Comparação dos padrões de “spoligotyping” e RFLP dos isolados de *M. tuberculosis*

Para determinar o potencial de aplicação da técnica de “spoligotyping” para a detecção de polimorfismo a nível de DNA para diferenciação de linhagens, os padrões de RFLP e “spoligotyping” obtidos de 65 isolados foram comparados. Quase todos os isolados que apresentaram o mesmo padrão de RFLP também tiveram o mesmo padrão de “spoligotyping”. No entanto, o número de padrões de RFLP encontrado foi superior ao encontrado por “spoligotyping” (57 e 48 respectivamente), o que evidencia um grau discriminatório maior para a técnica de RFLP. Isso ficou melhor evidenciado na análise de 3 isolados. Esses isolados poderiam ser considerados como pertencentes a mesma linhagem na análise por “spoligotyping” (mesmo padrão de hibridização) porém, eram linhagens diferentes, na análise por RFLP (padrões diferentes de RFLP). Apesar disso, 2 isolados tiveram o mesmo padrão de RFLP mas padrões diferentes de “spoligotyping”. Todos os isolados pertencentes ao grande grupo na análise por RFLP também pertenciam ao grande grupo na análise por “spoligotyping”.

O grau de diferenciação dos isolados de *M. tuberculosis* por “spoligotyping” foi menor para isolados com maior número de cópias de IS6110 que para isolados com baixo número de cópias. Assim, isolados com poucas cópias de IS6110 podem ser melhor caracterizados por “spoligotyping” que por RFLP. Da mesma forma, *M. bovis* BCG pode ser diferenciado de *M. tuberculosis* mais claramente pela técnica de “spoligotyping”. O padrão de RFLP é constituído de somente uma única banda de aproximadamente 2 Kb, o que dificulta sua diferenciação de isolados de *M. tuberculosis* que apresentem uma cópia do IS6110, enquanto que o padrão de hibridização por “spoligotyping” é formado por um conjunto característico de pontos de hibridização.

#### 4.DISSCUSSÃO

O aumento da incidência de infecção causada por *M. tuberculosis* tem tornado a identificação rápida do bacilo cada vez mais importante tanto para o diagnóstico como para o tratamento da tuberculose. O diagnóstico baseado na observação microscópica direta do bacilo é eficiente, mas pouco sensível. Por outro lado, o diagnóstico por cultura apesar de sensível e permitir a realização de testes de sensibilidade a antibióticos é bastante demorada (mais de 30 dias).

Um diagnóstico laboratorial para TB sensível e rápido é importante em todos os estágios da doença. A detecção na sua fase inicial é fundamental para auxiliar o diagnóstico clínico que em muitas situações é difícil e complicado, uma vez que os sintomas da doença podem ser confundidos com outras enfermidades. A detecção precoce da doença permite um tratamento adequado e efetivo. Desta forma, métodos alternativos para o diagnóstico da TB estão sendo desenvolvidos por vários grupos no mundo. Entre estes, destaca-se a utilização da técnica de PCR para a identificação de *M. tuberculosis*. Esta técnica tem se mostrado altamente sensível na detecção do bacilo em amostras clínicas como fluídos pleurais, escarro, urina, permitindo a detecção de uma baixo número de microrganismos em cada amostra (CORMICAN *et al.*, 1992; SCHLUGER *et al.*; 1994a; BEENHOUWER *et al.*, 1995; KULSKI & PRYCE, 1996). Por outro lado, a caracterização dos isolados de *M. tuberculosis* através de técnicas como o RFLP, é de grande importância em estudos epidemiológicos e pode contribuir para a análise de correlação com resistência a fármacos, virulência e localização de fontes de transmissão.

Neste trabalho foi descrito o aperfeiçoamento de um sistema para diagnóstico de TB e a caracterização de amostras de *M. tuberculosis* isoladas no Rio Grande do Sul. O sistema de diagnóstico foi baseado na amplificação de seqüências genômicas específicas de *M. tuberculosis* pela técnica de PCR. A caracterização de isolados foi realizada utilizando as técnicas de RFLP e “spoligotyping”.

Para o aperfeiçoamento do método de PCR foram analisadas a possibilidade de amplificação de duas regiões genômicas diferentes de *M. tuberculosis*, gene *Pab*

(SJÖBRING *et al.*, 1990) e IS6110 (EISENACH *et al.*, 1990). Os resultados obtidos foram concordantes com os obtidos por outros autores. Ambos os fragmentos gênicos foram amplificados isoladamente em reações de PCR com os “primers” específicos complementares às regiões nucleotídicas indicadas para o anelamento. O fragmento de 520 pb do gene *Pab* foi melhor visualizado em gel de agarose que o fragmento de 123 pb correspondente ao IS6110 quando os DNA utilizados eram extraídos de bactérias cultivadas em meio de cultura. Quando o DNA era extraído diretamente de amostras clínicas, o fragmento de 123 pb era mais facilmente detectado em gel de agarose que o fragmento de 520 pb. O número de amostras de escarros (positivas para TB nos testes bacteriológicos) positivas no PCR, era maior quando a amplificação era realizada com “primers” derivados de IS, independente do método de extração. A amplificação do fragmento *Pab* era melhor detectado somente após hibridização com sonda marcada com <sup>32</sup>P. Os trabalhos descritos que amplificaram segmentos de gene *Pab* diretamente de amostras clínicas utilizaram experimentos de hibridização com <sup>32</sup>P para a detecção (YUEN *et al.*, 1993; ZAMBARDI *et al.*, 1993). A melhor visualização do fragmento *Pab* nas amplificações com DNA de *M. tuberculosis* de culturas foi atribuído ao fato deste fragmento ser maior que o fragmento IS e portanto, mais facilmente visualizado em gel de agarose. As reações de PCR com “primers” de IS6110 produziram fragmentos de PCR detectáveis em um maior número de amostras clínicas. Possivelmente, isto ocorreu devido a presença de várias cópias de IS6110 no genoma, o que aumenta o número de fragmentos a serem amplificados, elevando a concentração final de seqüências de DNA amplificadas. Estes resultados confirmaram experimentos já descritos sobre a maior sensibilidade dos “primers” baseados no elemento IS6110 (VICTOR *et al.*, 1992; SHAWAR *et al.*, 1993; ZAMBARDI *et al.*, 1993; FORBERS & HICKS, 1993). A concentração de DNA de cultura utilizada para a amplificação com ambos os “primers” era elevada, o que possivelmente tornava irrelevante o fato do gene alvo ser cópia única ou não. Dessa forma, como o objetivo era a detecção de *M. tuberculosis* diretamente em amostras clínicas em gel de agarose para evitar etapas de hibridização, os “primers” escolhidos para os demais experimentos foram os baseados no IS6110.

A especificidade dos “primers” foi confirmada. Nenhuma outra espécie de micobactéria foi amplificada além das espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. A hibridização com a sonda correspondente ao fragmento Rep (posição 761 para 884 no genoma) não detectou homologia com DNA genômico de outras espécies testadas (maior ocorrência no Estado). A especificidade do IS6110 no complexo *M. tuberculosis* tem sido questionada (GILLESPIE *et al.*, 1997). KENT *et al.* (1995) mostraram homologia de uma região central do IS6110 com DNA de 24 micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. HELLYER *et al.* (1996) ao desenvolver um método de diagnóstico por PCR com “primers” correspondentes a uma região do IS6110 não encontrou essa homologia quando testou a especificidade com os mesmos DNA utilizados por KENT *et al.* (1995). Os autores concluíram então que, a detecção de outras micobactérias que não *M. tuberculosis* pode ter ocorrido por problemas de contaminação durante a preparação do DNA para o PCR ou que, a homologia relatada se restringiria a uma região central do IS6110 (correspondente a sonda utilizada nos experimentos) que é diferente da região amplificada por eles ou da descrita por EISENACH *et al.* (1990).

A etapa seguinte consistiu na determinação de um método para preparação do DNA da amostra clínica para o teste de PCR. Para testar métodos já descritos, amostras de escarro (positivas para TB na baciloscopia) foram tratadas por “glass beads” (SANTOS *et al.*, 1992) e fenol/clorofórmio (NOLTE *et al.*, 1993) a fim de promover lise celular e purificação do DNA. Produtos específicos de PCR foram gerados com amostras preparadas por ambos os métodos. Porém, a extração de DNA com fenol/clorofórmio mostrou pouca sensibilidade, pois, a maioria dos fragmentos de DNA só foram detectados após hibridização. A falta de sensibilidade pode ter sido motivada por perdas de DNA durante a purificação ou pela presença de resíduos de fenol. Com a extração por “glass beads”, a sensibilidade foi maior, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose. No entanto, foi detectada a presença de DNA degradado e além disso, a técnica mostrou-se muito trabalhosa e demorada para utilização em rotina de laboratório de análises clínicas.

O método mais simples de preparação de amostras clínicas descrito foi o método que utiliza fervura para liberação de DNA (KOCAGÖZ *et al.*, 1993). Assim, com a finalidade de testar a eficácia do método, 130 amostras diferentes foram utilizadas em reações de PCR após serem preparadas somente por fervura e após a inclusão de uma etapa de tratamento com pó de vidro para purificação de DNA. Os resultados evidenciaram que a amplificação de DNA de *M. tuberculosis* de amostras diferentes era possível após a liberação do DNA por fervura. Entretanto, em geral a sensibilidade era maior quando o DNA era purificado por pó de vidro. A inclusão da etapa de purificação com pó de vidro foi baseada no procedimento desenvolvido por VOGELSTEIN & GILLESPIE (1979). Neste procedimento um sal é utilizado para ligar o DNA ao pó de vidro e desnaturar as proteínas presentes na solução. O DNA é ligado seletivamente e após lavagem com etanol 70% pode ocorrer a eluição em tampão com baixa força iônica. Possíveis inibidores de *Taq* DNA polimerase podem ser removidos nesta etapa. Os testes de PCR realizados com amostras de escarro sem purificação com pó de vidro era ainda menos sensível que os testes de ZN. Em amostras de escarro o número de positivos aumentava de 20 para 37. Nas amostras de sangue o número de positivos aumentava de 4 para 8. Amostras de sangue foram previamente utilizadas para amplificação por outros autores (SCHLUGER *et al.*, 1994a; KOX *et al.*, 1996; CONDOS *et al.*, 1996; KULSKI & PRYCE, 1996). A análise de sangue para a presença de *M. tuberculosis* pode ser importante em casos de difícil colheita de material clínico (biópsias). Mesmo amostra de escarro nem sempre é de fácil obtenção, principalmente em crianças com suspeita de TB. A amplificação de DNA proveniente de amostras de urinas foi possível somente quando o DNA era purificado com pó de vidro. Possivelmente, inibidores da *Taq* DNA polimerase foram removidos durante a extração com pó de vidro.

A comparação dos resultados obtidos por PCR e por cultura demonstrou que a sensibilidade nas amostras de escarro era um pouco menor quando examinadas por PCR que por testes de cultura. É provável que alguns inibidores de enzima *Taq* DNA polimerase ainda permaneceram na preparação após a etapa de purificação com pó de vidro. Soro de pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar também foram

examinados por amplificação de DNA. A amplificação de DNA de *M. tuberculosis* em soro não havia sido relatado ainda. Nossos resultados positivos em amostras de soro foram obtidos, provavelmente devido a presença de leucócitos que permaneciam presentes no soro após a separação do sangue total por baixa centrifugação. Entretanto, um estudo detalhado é necessário para determinar a associação existente entre a presença de DNA de *M. tuberculosis* e a doença (tipos e fases da doença, uso de medicamentos, presença de HIV). Também, é importante determinar o tempo de detecção de DNA após iniciado o tratamento.

A análise de sensibilidade da técnica de PCR para a detecção de *M. tuberculosis* em amostras clínicas foi determinada pela contaminação de amostras negativas no PCR com *M. tuberculosis* provenientes de culturas. Nas condições desenvolvidas, o teste de PCR foi capaz de detectar 50 UFC de *M. tuberculosis* em escarro em gel de agarose. A sensibilidade foi 5 vezes maior em líquido e soro. A sensibilidade encontrada neste trabalho é a mesma descrita por SHAWAR *et al.* (1993). A sensibilidade relatada por outros pesquisadores tem sido de 1 a 100 UFC (BRISSENO-NOEL *et al.*, 1989; HANCE *et al.*, 1989; BÖDDINGHAUS *et al.*, 1990; COUSINS *et al.*, 1992). ABE *et al.* (1993) encontraram sensibilidade similar (10 UFC) quando compararam a detecção de *M. tuberculosis* por amplificação de rRNA. BUXTON *et al.* (1995) encontraram inibição 10 vezes maior com amostras de escarro amplificadas por PCR mesmo após extrações com fenol/clorofórmio. Esses dados reforçam o que foi sugerido anteriormente, que inibidores não foram totalmente removidos na etapa de purificação.

A detecção de produtos amplificados por PCR em gel de agarose, quando comparada com a detecção por hibridização mostrou praticamente a mesma sensibilidade. Este fato está de acordo com resultados relatados anteriormente (SHANKAR *et al.*, 1991; EISENACH *et al.*, 1990). WILSON *et al.* (1993a) demonstraram que o método colorimétrico desenvolvido para detecção de produtos de PCR com “primers” marcados com digoxigena era tão sensível quanto gel de agarose. As amostras positivas foram detectáveis em agarose e por colorimetria. Neste trabalho, uma das amostras positivas foi melhor visualizada por hibridização.

Nenhuma das amostras negativas em gel foi positiva na hibridização. No entanto, alguns trabalhos que compararam as duas técnicas demonstraram que a sensibilidade da detecção de *M. tuberculosis* por hibridização é maior do que pela análise em gel de agarose (SHAWAR *et al.*, 1993; ANDERSEN *et al.*, 1993; NOLTE *et al.*, 1993). Como a diferença de detecção de produto amplificado por gel de agarose e por hibridização encontrada neste trabalho não foi significativa, gel de agarose foi o método de detecção escolhido. Este método é de fácil manipulação e o custo é menor do que aquele dos procedimentos de hibridização.

Após o estabelecimento das condições de reação de amplificação, o protocolo de extração de amostra e de detecção de produtos amplificados utilizando as amostras com resultado de cultura e ZN conhecidos, o sistema de diagnóstico com todas as etapas estabelecidas foi aplicado à rotina de diagnóstico de TB para análise de diferentes amostras clínicas de pacientes suspeitos de TB. A comparação dos resultados obtidos por PCR com os testes de cultura evidenciou maior número de resultados positivos e negativos verdadeiros quando a amostra analisada era escarro. Usando PCR foi possível detectar 25 dos 29 casos de TB pulmonar enquanto por cultura somente 23 foram positivos (2 casos eram *M. avium*). Duas amostras tiveram resultados falso-negativo (PCR negativo e cultura positiva). A presença de inibidores de *Taq* DNA polimerase ainda presentes após o processo de extração poderia ser uma explicação para este resultado (YUEN *et al.*, 1993). No caso de LBA todas as 6 amostras positivas por PCR eram de pacientes que após terem recebido tratamento para TB, apresentaram melhora clínica. Portanto, mesmo sem cultura positiva, essas amostras foram consideradas como positivas verdadeiras. Em amostras de líquido é conhecido que micobactérias são visualizadas em apenas 10 a 20% das amostras e em testes de cultura a sensibilidade está entre 55 a 80% (BARRETT-CONNOR, 1967). Portanto, devido a severidade da meningite tuberculosa, PCR pode ser muito importante para possibilitar um diagnóstico rápido. Entre 14 amostras de líquido positivas por PCR somente 3 deram resultados positivos na cultura. Das 11 outras amostras, 3 foram colhidas do mesmo paciente em um período de 3 dias (o paciente recuperou-se após o tratamento para TB). Duas amostras eram provenientes de

pacientes com HIV que tiveram resultado de PCR positivo no sangue. Cinco amostras eram de pacientes que apresentaram melhora clínica após tratamento. Uma amostra era de um paciente sem informação. A partir desses dados, 13 amostras foram consideradas como positivas verdadeiras. A sensibilidade dos teste de cultura realizados com amostras de sangue é baixa (33%) (SMALL *et al.*, 1991). Das 6 amostras analisadas, 4 foram positivas na PCR e somente uma foi positiva na cultura. Das amostras que foram positivas no PCR mas negativas na cultura, 2 eram de pacientes que tiveram líquido positivo para TB em PCR. A outra amostra era de um paciente que teve recuperação após tratamento.

Todas as 21 amostras de soro que foram positivas por PCR foram negativas nos testes de cultura. Dezenove amostras eram de pacientes que tiveram resultado de cultura positiva em outro tipo de amostra (escarro, urina, fezes). Duas amostras eram de pacientes com TB crônica. Todas as 21 amostras foram consideradas positivas verdadeiras. Das 5 amostras de fluido pleural positivas por PCR, 2 foram negativas em cultura. Uma era de um paciente que teve resultado positivo de PCR em amostra de biópsia de pericárdio e a outra era de um paciente com diagnóstico de câncer. O resultado desta amostra foi considerado como provável falso positivo.

As amostras de urina e biópsia de pericárdio analisadas demonstraram o mesmo resultado em PCR e cultura (positivo). A amostra de fluido ascítico que foi positivo no PCR e negativo na cultura era de um paciente que melhorou após tratamento.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que a purificação de DNA com pó de vidro melhorou a detecção de *M. tuberculosis* em amostras clínicas. Possivelmente esta etapa é importante para remover componentes que inibem a *Taq* DNA polimerase. O procedimento pode ser útil principalmente para amostras clínicas que apresentem maiores problemas de inibição como amostras de escarro.

A especificidade (98%) e a sensibilidade (97,4%) da técnica de PCR proposta para detecção de *M. tuberculosis* com “primers” IS6110 foi semelhante ao encontrado em outro trabalho (ANDERSEN *et al.*, 1993; QUEROL *et al.*, 1995; AMICOSANTE *et al.*, 1995; CHO *et al.*, 1995). No entanto, considerando uma

comparação dos resultados obtidos com todas as amostras clínicas analisadas e os teste de cultura, a sensibilidade do método foi superior, 97,4% e 45,5%, respectivamente. Esta diferença foi principalmente devido a baixa sensibilidade da cultura em líquido, soro e sangue. A sensibilidade e especificidade de detecção de *M. tuberculosis* utilizando os testes comerciais em comparação com a cultura tem sido relatada. Os resultados encontrados em trabalhos mais recentes com o sistema Amplicor relataram variações de 40 a 85% para sensibilidade e em torno de 98% para especificidade (BERGMANN & WOODS, 1996; CARTUYVELS *et al.*, 1996; PIERSIMONI *et al.*, 1997). O sistema AMTD da Gen-Probe mostrou também resultados bem diversos. A sensibilidade variou de 83,9 a 95,9% e com especificidade de 98 a 100%.

O método de diagnóstico desenvolvido neste trabalho poderá ser incorporado à rotina de diagnóstico de laboratórios de análises clínicas, principalmente em laboratórios pertencentes ao sistema público de saúde. O procedimento é rápido (6h) e o custo com insumos é inferior a 2 dólares por amostra analisada. Esta estimativa está de acordo com WILSON *et al.* (1993a) que estimaram custos de aproximadamente 1 dólar. A aplicação pode ser de fundamental importância principalmente para casos de TB extrapulmonares e mesmo os casos de TB pulmonar de difícil diagnóstico.

A possibilidade de caracterizar isolados de *M. tuberculosis* pode auxiliar a localização de fontes de infecção, surtos e microepidemias. Identificar linhagens existentes no Estado e a sua correlação com virulência, resistência e outras doenças como HIV pode ser de extrema importância. A identificação de linhagens através de “fingerprinting” de DNA cromossomal com marcadores específicos tem sido utilizada em estudos epidemiológicos de TB. Um maior entendimento sobre a disseminação da bactéria em uma população definida poderá auxiliar a detectar mais rapidamente casos novos e controlar a transmissão da doença.

A análise de DNA por RFLP baseados principalmente no elemento de inserção IS6110 tem demonstrado alto grau de diferenciação de isolados de *M. tuberculosis* possibilitando estudar a epidemiologia da TB a nível molecular e

detectar fontes de infecção da doença pela diferenciação clonal dos isolados (MAZUREK *et al.*, 1991; VAN SOOLINGEN *et al.*, 1992; DWYER *et al.*, 1993; COLLINS *et al.*, 1993; HERMANS *et al.*, 1995). Recentemente, a técnica denominada “spoligotyping” foi estabelecida para diferenciação de isolados com base na seqüência de “spacer” encontrada dentro da região DR (KAMERBEEK *et al.*, submetido à publicação). Esta técnica é mais rápida, pois envolve procedimentos de execução mais simples que os realizados em análises por RFLP.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar o potencial de caracterizar *M. tuberculosis* isolados no Rio Grande do Sul pela análise de polimorfismo de DNA através das técnicas de RFLP e “spoligotyping”. Para a análise dos isolados por RFLP foram utilizadas as sondas complementares aos elementos de inserção IS6110 e IS1081. A análise do padrão de bandas obtidos por RFLP associado ao IS6110 de 80 isolados evidenciou 57 padrões distintos. Apesar de 13 grupos de pacientes (cada grupo com 1, 2 ou 3 pacientes) dividirem o mesmo padrão de RFLP, existia uma grande diversidade entre os isolados, constatada pelo número elevado de padrões de RFLP encontrado. Os padrões de RFLP associados ao IS6110, observados nos isolados, eram caracterizados, na maioria, pela presença de um alto número de cópias desse elemento (7 ou mais cópias) representando 96% do total de isolados analisados. Esta distribuição do número de cópias está de acordo com o descrito sobre a distribuição em outros países (CHEVREL-DELLAGI *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 1994). O número de isolados de *M. tuberculosis* com baixo número de cópias de IS6110 é bem inferior ao número de isolados com várias cópias. Também, foi constatado o potencial de caracterização de isolados de *M. tuberculosis* pela técnica de RFLP associada ao IS6110, pois a presença de múltiplas cópias desse elemento em locais diferentes no genoma gerou polimorfismo suficiente para diferenciar um isolado de outro (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1991). Apenas 3 isolados apresentavam apenas 2 ou 3 cópias do elemento. A diferenciação de isolados de *M. tuberculosis* com poucas cópias de IS6110 pela detecção de polimorfismo genômico é difícil, devido à integração de IS6110 acontecer em sítios preferenciais no genoma de micobactérias (SMALL *et al.*, 1994; HERMANS *et al.*, 1991; VAN SOOLINGEN *et*

*et al.*, 1993). Para estes isolados, o polimorfismo de DNA é melhor detectado utilizando marcadores para regiões de outros elementos repetitivos como PGRS e DR (MARCH *et al.*, 1996).

Isolados de um mesmo paciente proveniente de amostras clínicas colhidas em dias ou locais de infecção diferentes demonstraram padrão de bandas idênticos. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por HERMANS *et al.* (1990b), que demonstraram que nenhuma modificação ocorria no padrão de RFLP após o crescimento de *M. tuberculosis* em cobaia. OTAL *et al.* (1991) também não evidenciaram modificações nos padrões de RFLP de isolados de pacientes após 2 anos em relação ao RFLP realizado no início do tratamento. Neste trabalho, 2 pacientes tiveram isolados de *M. tuberculosis* que diferiam em apenas uma banda, possivelmente, como resultado de um evento de inserção. Resultados similares já foram descritos em outros trabalhos (MAZUREK *et al.*, 1991; CHEVREL-DELLAGI *et al.* 1993). CHEVREL-DELLAGI *et al.* (1993) demonstraram que uma cópia de IS podia não estar presente no DNA em algumas colônias isoladas de uma linhagem de *M. tuberculosis* cultivada em meio sólido. Essa diferença pode ser devido ao fato de que a seqüência IS6110 possui a habilidade de transposição (THIERRY *et al.*, 1990). No entanto, evidências indicam que eventos de transposição desse elemento ocorrem raramente. Mudança similar pode ocorrer durante a transmissão do bacilo entre pacientes. No entanto, em todos os casos analisados a diferença era limitada a somente uma cópia. Como a maioria das linhagens de *M. tuberculosis* analisadas continha mais de sete cópias de IS6110, o padrão de RFLP de um isolado pode manter-se inalterado por longos períodos de tempo. A mudança em um único fragmento de restrição não prejudicaria a análise de padrões de RFLP.

Desde que as amostras foram escolhidas aleatoriamente, provenientes de pacientes de postos de saúde diferentes, localizados na cidade de Porto Alegre e no interior do Estado (70% dos doentes com TB estão localizados na grande Porto Alegre), os resultados encontrados foram considerados uma amostra da variabilidade de polimorfismo que pode ser encontrada no Estado. O alto grau de polimorfismo encontrado nas análises está de acordo com os achados de VAN SOOLINGEN *et al.*

(1991). Eles sugerem que o grau de polimorfismo pode estar relacionado com a estabilidade da população. O grau de diversidade é mais elevado em cidades maiores ou em regiões com população mais heterogênea, uma vez que, as linhagens são provenientes de regiões geográficas diferentes. O Estado do Rio Grande do Sul é formado por uma população bastante heterogênea. Sendo assim, o grau de polimorfismo encontrado foi elevado o suficiente para permitir estudos epidemiológicos utilizando análise de DNA por RFLP associado ao IS6110.

Através de matriz de similaridade foi possível evidenciar que apesar do elevado grau de polimorfismo existia alto grau de similaridade entre os *M.tuberculosis* isolados no Estado. 65% dos fragmentos eram compartilhados por 44% dos isolados. Este fato, possivelmente, pode ser devido à descendência dos isolados de um único clone que se expandiu num passado recente. Também é importante considerar que no Brasil, mais de 90% da população em idade infantil é vacinada com BCG, isso pode provocar uma seleção de alguns clones que seriam mais resistentes à vacinação.

Nenhuma correlação foi evidenciada entre os padrões de RFLP e resistência dos isolados de *M. tuberculosis* a fármacos antituberculose. A resistência de *M. tuberculosis* aos fármacos é principalmente causada por tratamento inadequado que seleciona mutantes (resistência adquirida). Estas linhagens resistentes podem ser transmitidas a outros indivíduos. A identificação dessas linhagens através de seus RFLPs poderia auxiliar na busca de tratamentos adequados a pacientes com essas linhagens mutantes (CULLITON, 1992).

Os DNAs dos isolados foram também analisados por RFLP utilizando como sonda o elemento de transposição IS1081. Os resultados encontrados neste trabalho confirmaram que os padrões de banda obtidos com este elemento são muito mais uniformes que os obtidos com a sonda IS6110, provavelmente, devido aos eventos de transposição acontecerem com uma frequência ainda menor, que as transposições de IS6110 (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1992; 1993; YANG *et al.*, 1994). O grau de polimorfismo associado ao IS1081 foi bastante limitado, sendo difícil sua utilização para caracterização de isolados. A maioria dos 80 padrões de RFLP-IS1081 obtidos

dos isolados de *M. tuberculosis* analisados apresentou de 5 a 6 cópias de IS1081. 90% dos padrões de banda apresentava 4 fragmentos de restrição comuns. Todos os isolados que possuíam o mesmo padrão de RFLP-IS6110 também tinham o mesmo padrão de RFLP-1081. Porém, os isolados com o mesmo padrão de IS1081 apresentavam, na maioria, padrões bem diversos de RFLP-IS6110. Todos os isolados do mesmo paciente tinham o mesmo padrão de RFLP-IS1081.

*M. bovis* BCG utilizada como padrão diferia de todos os isolados de *M. tuberculosis* pela presença de um fragmento de restrição de 8,0 Kb no padrão de RFLP-IS1081. Quando a análise era referente ao padrão de RFLP-IS6110 a mesma linhagem apresentava apenas uma única banda de aproximadamente 1,5 Kb. Este padrão único de RFLP-IS1081 pode ser útil para diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*. Essa diferenciação é bem difícil de realizar por reações bioquímicas clássicas ou crescimento característico. A diferenciação dessas duas espécies pode ser particularmente útil, devido ao aumento no número de casos relatados de pessoas imunodeprimidas com TB causada por reativação de *M. bovis* BCG (ARMBRUSTER *et al.*, 1990; GUTIÉTERREZ *et al.*, 1995). A presença desse fragmento de 8,0 Kb em *M. bovis* nos “fingerprints” gerados por RFLP associados a IS1081 ainda é desconhecida. No entanto, especula-se a possibilidade que esta característica genética esteja relacionada com a não virulência deste *Mycobacterium*, talvez por inserção deste elemento em uma região cromossomal essencial à patogenicidade.

Apesar de a técnica de RFLP associada ao elemento IS6110 ter demonstrado excelente poder discriminatório na análise de isolados de *M. tuberculosis*, podendo ser útil na caracterização de isolados pela detecção de polimorfismo de DNA nesta região IS, o procedimento foi muito trabalhoso e demorado. As dificuldades encontradas para o desenvolvimento da metodologia despertou interesse na busca de uma técnica alternativa mais viável para uso em rotinas de investigação epidemiológica.

Recentemente, outro método de tipificação foi descrito, o “spoligotyping” (KAMERBEEK *et al.*, submetido à publicação) e tem sido utilizado para caracterizar isolados de *M. tuberculosis* (ARANAZ *et al.*, 1996; GOYAL *et al.*, 1997). Este

método detecta polimorfismo na seqüência de região DR utilizando como marcadores oligonucleotídeos complementares aos “spacers” que hibridizam com produtos de amplificação gerando padrões de hibridização (“spoligotypes”). O procedimento além de mais rápido e simples, poderia apresentar uma sensibilidade na detecção de DNA de *M. tuberculosis*, uma vez que a técnica incluía etapa de amplificação por PCR. Testes realizados pelos autores, demonstraram a possibilidade de identificar polimorfismo em isolados de *M. tuberculosis* diretamente em amostras clínicas, sem a necessidade de cultivar os isolados, o que reduziria o tempo em no mínimo um mês.

Para analisar o potencial de tipificação desta metodologia foram examinados 107 DNAs de *M. tuberculosis* isolados no Rio Grande do Sul. 67 desses isolados foram também analisados por RFLP-S6110 podendo assim ser comparados quanto a capacidade discriminatória do polimorfismo. Conforme esperado, a técnica mostrou elevada sensibilidade na detecção de DNA. 10 ng de DNA foram utilizados para as análises contrastando com os 4 µg necessários para uma análise por RFLP. KAMERBEEK *et al.* (submetido à publicação) constataram uma sensibilidade da técnica para detecção de 1fg de DNA (corresponde ao genoma de uma micobactéria). Entretanto, o padrão de banda de hibridização independia da quantidade de DNA utilizado. A reprodutibilidade do método ficou evidenciada quando amostras de DNA isoladas de culturas de material biológico do mesmo paciente tiveram o mesmo “spoligotyping”.

Todos os isolados analisados foram identificados por “spoligotyping” como *M. tuberculosis* (essa região é específica da espécie) com a característica comum de gerarem “spoligotypes” sem sinal de hibridização com os “spacers” 33, 34, 35 e 36. Esses “spacers eram complementares somente ao produto amplificado derivado de *M. bovis* utilizado como controle, já previamente demonstrado conter essas seqüências (GROENEN *et al.*, 1993). Havia um grupo de isolados (55%) que não hibridizava com os “spacers” 21, 22, 23 e 24.

A comparação dos “fingerprints” de DNA gerados por “spoligotyping” com os gerados por RFLP-IS6110 demonstrou um menor grau de diferenciação de isolados

de *M. tuberculosis* quando o polimorfismo foi analisado na seqüência de região DR por “spoligotyping”. Alguns isolados possuíam “spoligotypes” iguais, mas diferentes padrões de RFLP. Ficou evidenciado que a diferenciação de isolados obtida por “spoligotyping” era menor quando o DNA carregava um maior número de cópias de IS6110. Esses resultados confirmaram os resultados descritos por outros autores (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1995; ARANAZ *et al.*, 1996; GOYAL *et al.*, 1997). Porém, DNAs com poucas cópias eram melhor ou igualmente diferenciados. Esse fato é particularmente importante justamente porque linhagens com poucas cópias de IS6110 não podem ser diferenciadas por RFLP além disso é possível distinguir *M. bovis* de *M. tuberculosis*.

Apesar de o grau de diferenciação de isolados *M. tuberculosis* obtido pela técnica de “spoligotyping” ter sido inferior ao obtido por RFLP-IS6110, a metodologia demonstrou ser promissora e com importantes vantagens sobre a técnica de RFLP como a possibilidade de detecção e tipificação de *M. tuberculosis* em um mesmo procedimento e diretamente do material biológico do paciente. A metodologia é de execução simples e rápida, sem necessidade de etapas de “Southern blotting”, o que permitiria tipificação em grande escala e passível de implantação na rotina de laboratórios de saúde pública. O procedimento é seguro e econômico, uma vez que as membranas, com os oligonucleotídeos, utilizadas permitiriam a detecção de aproximadamente 45 isolados simultaneamente e podem ser reutilizadas no mínimo 20 vezes. Acredita-se que o nível de diferenciação pode ser aumentado com o seqüenciamento de outros isolados de *M. tuberculosis* para determinação de novas seqüências de “spacers” para construção de mais oligonucleotídeos. O acréscimo de novos oligonucleotídeos ao teste poderá promover novos padrões de hibridização evidenciando com maior clareza o polimorfismo na região DR. No entanto, mesmo com o presente poder discriminatório, esta metodologia já possui um grande valor para determinar com rapidez situações de surtos infecciosos em hospitais e outros locais suspeitos de serem fontes de transmissão.

## 5. RESUMO

A tuberculose é ainda uma das mais importantes doenças infecciosas no mundo, particularmente em países em desenvolvimento. No Brasil, ocorrem 10 casos novos por hora e morrem 14 doentes por dia. O controle da tuberculose tem sido realizado, principalmente, na identificação e tratamento de pessoas com tuberculose ativa. Os métodos tradicionais para identificar a doença são ainda pouco sensíveis ou muito demorados. A detecção de *M. tuberculosis* em amostras clínicas por “polymerase chain reaction” (PCR) tem sido descrita. Entretanto, apesar do sucesso do PCR para detectar DNA de *M. tuberculosis* diretamente em amostras clínicas, a implantação do método na rotina de laboratórios de saúde pública não tem sido incorporada facilmente. Problemas como contaminação, inibição, métodos de extração de DNA trabalhosos e custo elevado não foram ainda totalmente resolvidos. Os métodos que permitem a caracterização de isolados de *M. tuberculosis* são importantes para, através de investigações epidemiológicas, correlacionar doentes e localizar fontes de infecção, possibilitando a interrupção da transmissão. Recentemente, muitos métodos foram descritos para detectar polimorfismo em diferentes regiões do DNA. No entanto, somente a técnica de “restriction fragment length polymorphism” (RFLP) tem demonstrado adequada sensibilidade e reprodutibilidade. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer métodos para diagnosticar a tuberculose e caracterizar isolados de *M. tuberculosis*. O método de diagnóstico escolhido foi baseado na técnica de PCR por ser de execução rápida e permitir detectar baixo número de microorganismos. Como a sensibilidade do PCR é bastante dependente de uma preparação da amostra antes da amplificação, esforços foram feitos, principalmente, para estabelecer um método para purificar o DNA de *M. tuberculosis* proveniente da amostra clínica. Uma etapa de purificação de DNA com pó de vidro foi incluída ao método de fervura. Várias amostras foram então testadas (incluindo escarro, líquor, sangue, soro e urina). Os resultados foram comparados com os diagnósticos clínico e bacteriológico dos pacientes. Também foram analisados por RFLP associado ao IS6110 e IS1081, vários DNAs de *M. tuberculosis* isolados no Rio Grande do Sul com o objetivo de adaptar a técnica e verificar a capacidade de distinguir os isolados. Apesar das análises por RFLP mostrarem excelente capacidade de diferenciar e correlacionar os isolados, a técnica é trabalhosa, demorada e de custo elevado, dificultando sua utilização. Assim, análises de DNA de *M. tuberculosis* foram realizadas por “spoligotyping” que detecta polimorfismo na região DR utilizando amplificação por PCR. Ambos os métodos foram comparados e apesar da técnica de “spoligotyping” ser mais simples e rápida que RFLP, o grau de diferenciação obtido dos isolados foi menor para espécies com alto número de cópias de IS6110. No entanto, a metodologia mostrou potencial para sua utilização em rotinas de laboratórios se mais oligonucleotídeos forem incluídos no teste.

## 6. ABSTRACT

Tuberculosis is one of the most important infectious diseases in the world, particularly in developing countries. In Brazil, ten new cases occur every hour and fourteen patients die per day. The control of tuberculosis has been mainly based on the identification and treatment of the patients with active disease. The traditional methods to identify the infection are still of low sensitivity or time consuming. The detection of *M. tuberculosis* species in clinical samples by polymerase chain reaction (PCR) has been reported. However, despite the success of PCR to detect *M. tuberculosis* DNA directly in clinical specimens, the method has not been easily incorporated to the routine procedure in public health laboratories. Problems such as contamination, inhibition, laborious and expensive methods are not completely solved. The methods to identify *M. tuberculosis* isolates are very important, since they can be used in epidemiological studies, giving information about possible correlations of TB patients allowing the interruption of the transmission chain. Recently, several methods for the identification and strain relationship among isolates of *M. tuberculosis* have been described, some methods are based on the analysis of DNA digested by restriction enzymes (like restriction fragment length polymorphism, RFLP) and methods based on DNA amplification. However, the only system described so far with the required reproducibility and sensitivity is the RFLP method. This work was developed aiming to establish methods to detect tuberculosis in different clinical samples and to characterize isolates of *M. tuberculosis*. The method for diagnosis based on the PCR technique was chosen because it is simple and allows the detection of a low number of microorganisms. Since the sensitivity of PCR is quite dependent of an efficient preparation of specimen before amplification, efforts were mainly done to establish a method for purification of DNA from samples. We established a modification of the heating method for releasing DNA. The inclusion of a single glass matrix purification step improved the amplification of the *M. tuberculosis* DNA in clinical samples (including sputum, cerebrospinal fluid, blood, serum and urine). The results were compared to clinical and bacteriological diagnosis. In addition, we analysed *M. tuberculosis* isolates from Rio Grande do Sul by RFLP associated to the insertion IS6110 and IS1081, to optimise the method and verify its sensitivity for the detection of DNA polymorphism. Although RFLP analysis sequences offers an accurate evaluation of the relationships among isolates, its use by laboratories in developing countries is very difficult because it is laborious, time consuming and expensive. For this reason we have characterized the isolates by spoligotyping which detects polymorphism by PCR amplification of the DR region. Both methods were compared showing that the degree differentiation of *M. tuberculosis* by spoligotyping was less sensitivity to detect strains with high number of IS6110 copies. However, the methodology has a good potential to be used in routine procedures, if more oligonucleotides are included in the test.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, C.; HOSOJIMA, S.; FUKASAWA, Y.; KASUMI, Y.; TAKAHASHI, M.; HIRANO, K.; MORI, T. Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 878-881, 1992.
- ABE, C.; HIRANO, K.; WADA, M.; KAZUMI, Y.; TAKAHASHI, M.; FUKASAWA, Y.; YOSHIMURA, T.; MIYAGI, C.; GOTO, S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 3270-3274, 1993.
- ALTAMIRANO, M.; KELLY, M. T.; WONG, A.; BESSUILE, E. T.; BLACK, W. A.; SMITH, J. A. Characterization of a DNA probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 2173-2176, 1992.
- AMICOSANTE, M.; RICHELDI, L.; TRENTI, G.; GREGORINO, P.; CAMPA, M.; BISETTI, A.; SALTINI, C. Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 629-630, 1995.
- ANDERSEN, A.B.; HANSEN, E.B. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, 57:2481-2488, 1989.
- ANDERSEN, A.B.; ANDERSEN, P.; LJUNGQVIST, L. Structure and function of a 40,000-molecular-weight protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, 60: 2317-2323, 1992.
- ANDERSEN, A. B.; THYBO, S.; GODFREY-FAUSSETT, P.; STOKER, N. G. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 12: 922-927, 1993.
- AOKI, Y.; YAMADA, H. Clinical application of microplate DNA-DNA hybridization procedure for rapid diagnosis of micobacterial infections. **Tub. Lung Dis.**, 75: 213-219, 1994.
- ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L.; VIDAL, D.; DOMINGO, M.; GONZOLEZ, O.; RODRIGUEZ-FERRI, E. F.; BUNSCHOTEN, A.; VAN EMBDEN, J. D. A.; COUSINS, D. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, 34(11): 2734-2740, 1996.

- ARMBRUSTER, C.; JUNKER, W.; VETTER, N.; JAKSCH, G. Disseminated Bacille Calmette-Guérin infection in an AIDS patient 30 years after BCG vaccination. **J. Infect. Dis.**, 162: 1216, 1990.
- ATLAS, RONALD M. (Ed). **Microorganisms in our World**. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc, 1995.
- BARDANA JR.; McCLATCHY, J.K.; FARR, R.S.; MINDEN, P. Universal occurrence of antibodies to tubercle bacilli in sera from non-tuberculous and tuberculous individuals. **Clin. Exp. Immunol.**, 13: 65-77, 1973.
- BARNES, P. F.; BARROWS, S.A. Tuberculosis in the 1990's. **Ann. Intern. Med.**, 119: 400-410, 1993.
- BARRETT- CONNOR, E. Tuberculous meningitis in adults. **South. Med. J.**, 60: 1061-1067, 1967.
- BATES, J. H. Tuberculosis: susceptibility and resistance. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 125: 20-24, 1982.
- BEENHOUWER, H.; LIANG, Z.; RIJK, P.; VAN EEKEREN, C.; PORTAELS, F. Detection and identification of mycobacteria by DNA amplification and oligonucleotide-specific capture plate hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 2994-2998, 1995.
- BENNEDSEN, J.; THOMSEN, V. O.; PFYFFER, G. E.; FUNKE, G.; FELDMANN, K.; BENEKE, A.; JENKINS, A.; HEGGINBOTHOM, M.; FAHR, A.; HENGSTLER, M.; CLEATOR, G.; KLAPPER, P.; WILKINS, G. L. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 1407-1411, 1996.
- BERGMANN, J. S.; WOODS, G. L. Clinical evaluation of the Roche AMPLICOR PCR *Mycobacterium tuberculosis* test for detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 1083-1085, 1996.
- BLOOM, B. R.; MURRAY, C. J. L. Tuberculosis: comentary on a reemergent killer. **Science**, 257: 1055-1064, 1992.
- BLOOM, B. R. **Tuberculosis: patogenesis, protection, and control**. ASM Press, Washington, DC, 1994.
- BÖDDINGHAUS, B.; ROGALL, T.; FLOHR, T.; BLÖCKER, H.; BÖTTGER, E. C. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. **J. Clin. Microbiol.**, 28: 1751-1759, 1990.

- BODMER, T.; GURTNER, A.; SCHOPFER, K.; MATTER, L. Screening of respiratory tract specimens for the presence of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 1483-1487, 1994.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, 28: 495-503, 1990.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão de Pneumologia Sanitária. Campanha Nacional contra a tuberculose. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço/CNTC/NUTES**. 3. ed. rev. Rio de Janeiro, 1992.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1994.
- BRASIL. 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, 1995.
- BRISSON-NOEL, A.; GICQUEL, B.; LECOSSIER, D.; LEVY-FRÉBAULT, V.; NASSIF, X.; HANCE, A. J. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. **The Lancet**, 1069-1071, 1989.
- BRISSON-NOEL, A.; AZNAR, C.; CHUREAL, C.; NGUYEN, S.; PIERRE, C.; BARTOLI, M.; BONETE, R.; PIALOUX, G.; GICQUEL, B.; GARRIGUE, G. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. **The Lancet**, 338: 364-366, 1991.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N.; JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBREG, E. A. **Med. Microbiol.**, 20. ed., 1995.
- BUTLER, W. R.; HASS, W. H.; CRAWFORD, J. T. Automated DNA fingerprinting analysis of *Mycobacterium tuberculosis* using fluorescent detection of PCR products. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 1801-1803, 1996.
- BUXTON, Q. D.; HENDRICKS, A.; ROBINSON, L.; SHAH, J.; LU, L.; VERA-GARCIA, M.; KING, W.; OLIVE M. D. Comparison of amplified Q $\beta$  replicase and PCR assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, 860-867, 1995.
- CANETTI, G.; GROSSET. **Techniques et indications des examens bacteriologiques en tuberculose**. St. Mandé. Ed. de la Tourelle. Paris, 1968.

- CANTUEL, M. F.; SNIDER, D. E.; CAUTHEN, G. M.; ONORATO, I. M. Epidemiology of tuberculosis in the United States, 1985 through 1992. **JAMA**, 272(7): 535-539, 1994.
- CARTUYVELS, R.; RIDDERS, C.; JONCKHEERE, S.; VERBIST, L.; VAN ELDERE, J. Prospective clinical evaluation of amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test as a screening method in a low-prevalence population. **J. Clin. Microbiol.** 34 (8): 2001-2003, 1996.
- CAVE, M. D.; EISENACH, K. D.; McDERMOTT, P. F.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. **Mol. Cell. Probes**, 5: 73-80, 1991.
- CAVE, M. D.; EISENACH, K. D.; TEMPLETON, G.; SALFINGER, M.; MAZUREK, G. H.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 262-266, 1994.
- CHAISSON, R. E.; SCHECTER, G. P.; THEUER, C. P.; RUTHERFORD, G. W.; ECHENBERG, D. F.; HOPEWELL, P. E. Tuberculosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Am. Rev. Respir. Dis.** 136: 570-574, 1987.
- CHEVREL-DELLAGI, D.; ABDERRAHMAN, A.; HALTITI, R.; KOUBAJI, H.; GICQUEL, B.; DELLAGI, K. Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 2446-2450, 1993.
- CHO, S. N.; VAN DER VLIET, G. M. E.; PARK, S.; BAIK, S. H.; KYM, S. K.; CHONG, Y.; KOLK, A. H. J.; KLATSER, P. R.; KIM, J. D. Colorimetric microwell plate hybridization assay for detection of amplified *Mycobacterium tuberculosis* DNA from sputum samples. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 752754, 1995.
- CIMINO, G. D.; METCHETTE, K. C.; TESSMAN, J. W.; HEARST, J. E.; ISAACS, S. T. Post PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. **Nuc. Acids Res.**, 19: 99-107, 1990.
- CLARK-CURTISS, J. E.; WALSH, G. P. Conservation of genomic sequences among isolates of *Mycobacterium leprae*. **J. Bacteriol.**, 171: 4844-4851, 1990.
- COLLINS, D. M.; de LISLE, G. W. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. **J. Clin. Microbiol.**, 130: 1019-1021, 1984.

- COLLINS, D.M.; STEPHENS, D.M. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 83: 11-16, 1991.
- COLLINS, D. M.; ERASMUSON, S. K.; STEPHENS, D. M.; YATES, G. F.; DE LISLE, G. W. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 1143-1147, 1993.
- CONDOS, R.; McCLUNE, A.; ROM, W.N.; SCHLUGER, N.W. Peripheral-blood-based PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis. **Lancet**, 347: 1082-1085, 1996.
- CORMICAN, M. G.; BARRY, T.; GANNON, F.; FLYNN, J. Use of polymerase chain reaction for early identification of *Mycobacterium tuberculosis* in positive cultures. **J. Clin. Pathol.**, 45: 601-604, 1992.
- COUSINS, D. V.; WILTON, S. D.; FRANCIS, B. R.; GOW, B. L. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 255-258, 1992.
- CULLITON, B. J. Drug resistant TB may bring epidemic. **Nature**, 356: 473, 1992.
- CRAWFORD, J. T.; BATES, J. H. Phage typing of mycobacteria, in "The Mycobacteria: a sourcebook, Part A" ( KUBICA, G. P. & WAYNE, L. W. ) ( pp. 123-132). **Marcel Dekker, Inc.**, New York, 1984.
- DALEY, C. L.; SMALL, P. M.; SCHECTER, G. F.; SCHOOLNIK, G. K.; McADAM, R. A.; JACOBS Jr., W. R.; HOPEWELL, P. C. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus: an analysis using restriction fragment length polymorphisms. **N. Engl. J. Med.**, 326: 231-235, 1992.
- DANIEL, T. M.; DEBANNE, S. M. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 135: 1137-1151, 1987.
- DANIEL, T. M. Rapid diagnosis of tuberculosis: laboratory techniques applicable in developing countries. **Rev. Infect. Dis.**, 2(2): 471-478, 1989.
- DANIEL, T. M.; DEBANNE, S. M.; VAN DER KUYP, F. Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and PPD for the serodiagnosis of tuberculosis. **Chest**, 88: 388-392, 1985.

- DENIS, O.; LOZES, E.; HUYGEN, K. Induction of cytotoxic T-cell responses against culture filtrate antigens in *Mycobacterium bovis bacillus* Calmette-Guerin-infected mice. **Infect. Immun.**, 65:676-684, 1997.
- DE WIT, D.; WOOTTON, M.; ALLAN, B.; STEYN, L. Simple method for production of internal control DNA for *Mycobacterium tuberculosis* polymerase chain reaction assays. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 2204-2207, 1993.
- DEL PORTILLO, P.; MURILLO, L. A.; PATARROYO, M. E. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 2163-2168, 1991.
- DEL VECHIO, M. A.; SMITH, K. P.; LOELFEHOLZ, M.; SPADORO, J. Amplicor mycobacteria polymerase chain reaction assays: clinical performance and future applications. Frontiers. In: **Mycobacteriology - Multi-drug resistant tuberculosis: Where do we Stand? Where are we headed?**, Colorado, p. 23 (abstract 10), 1994.
- DENHARDT, D. A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 23: 614-656, 1966.
- DOOLEY, S. W.; VILLARINO, M. E.; LAWRENCE, M. Nosocomial transmission of in a hospital unit for HIV-infected patients. **JAMA**, 267: 2632-2634, 1992.
- DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W. An efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nuc. Acids Res.**, Oxford, 16: 6127-6145, 1988.
- DROBNIEWSKI, F. A.; KENT, R. J.; STOKER, N. G.; UTTLEY, A. H. C. Molecular biology in the diagnosis and epidemiology of tuberculosis. **J. Hosp. Infect.**, 28: 249-263, 1994.
- DWYER, B.; JACSON, K.; RAIOS, K.; SIEVERS, A.; WILSHIRE, E.; ROSS, B. DNA restriction fragment analysis to define an extended cluster of tuberculosis in homeless men and their associates. **J. Infect. Dis.**, 167: 490-494, 1993.
- EDLIN, B. R.; TOKARS, J. I.; GRIECO, M. H.; CRAWFORD, J. T.; WILLIAMS, J.; SORDILLO, E. M.; ONG, K. R.; KILBURN, J. O.; DOOLEY, S. W.; CASTRO, K. G.; JARVIS, W. R.; HOLMBERG, S. D. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, 326: 1514-1521, 1992.
- EDWARDS, P.; EDWARDS, L. Story of the tuberculin test from an epidemiologic viewpoint. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 81: 1-47, 1960.

- EHLERS, S.; IGNATIUS, R.; REGNATH, T. HAHN, H. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. **J. Clin. Microbiol.**, 34:2275-2279, 1996.
- EISENACH, K. D.; CRAWFORD, J. T.; BATES, J. H. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 2240-2245, 1988.
- EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.**, 161: 977-981, 1990.
- ELLNER, J. J. Immune dysregulation in human tuberculosis. **J. Lab. Clin. Med.**, 108: 142-149, 1986.
- ELLNER, P. D.; KIEHN, T. E.; CAMMARATA, R.; HOSMER, M. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. **J. Clin. Microbiol.**, 26(7): 1349-1352, 1989.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Quantification of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. **J. Immunol.**, 109: 129-135, 1972.
- ETKIND, S. C. The role of the public health department in tuberculosis. **Med. Clin. North Am.**, 77: 1303-1314, 1993.
- FARER, L. S.; LOWELL, L. M.; MEADOR, M. P. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. **Am. J. Epidemiol.**, 109: 205-217, 1979.
- FOLGUEIRA, L.; DELGADO, R.; PALENQUE, E.; NORIEGA, A. R. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 1019-1021, 1993.
- FORBES, B. A.; HICKS, K. E. S. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 1688-1694, 1993.
- FRIES, J. W. U.; PATEL, R. J.; PIESSENS, W. F.; WIRTH, D. F. Detection of untreated mycobacteria by using polymerase chain reaction and specific DNA probes. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 1744-1747, 1991.
- GILLESPIE, S. H.; McHUGH, T. D.; NEWPORT, L. E. Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J. Clin. Microbiol.**, 35(3): 799-801, 1997.

- GLATMAN-FREEDMAN, A.; MARTIN, J. M.; RISKA, P. F.; BLOOM, B. R.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibodies to surface antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their use in a modified enzyme-linked immunosorbent spot assay for detection of mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.**, 34(11): 2795-2802, 1996.
- GODFREY-FAUSETT, P.; MORTIMER, P. R.; JENKINS, P. A.; STOKER, N. G. Evidence of transmission of tuberculosis by DNA fingerprinting. **Br. Med. J.**, 305: 221-223, 1992.
- GOYAL, M.; SAUNDERS, N. A.; VAN EMBDEN, J. D. A.; YOUNG, D. B.; SHAW, R. J. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Spoligotyping and IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism. **J. of Clin. Microbiol.**, 35: 647-651, 1997.
- GROENEN, P. M. A.; BUNSCHOTEN, A. E.; VAN SOOLINGEN, D.; VAN EMBDEN, J. D. A. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. **Mol. Microbiol.** 10: 1057-1065, 1993.
- GRUFT, H.; JOHNSON, R.; CLAFIN, R.; LODER, A. Phage-typing and drug-resistance patterns as tools in mycobacterial epidemiology. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 130: 96-97, 1984.
- GUTIÉRREZ, M.; SAMPER, S.; GAVIGAN, J. A.; MARÍN, J. F. G.; MARTÍN, C. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 2953-2956, 1995.
- HAAS, D. W.; PREZ, R. M. D. Tuberculosis and acquired immunodeficiency syndrome: a historical perspective on recent developments. **Am. J. Med.**, 96: 439-450, 1994.
- HAMPSON, S. J. J.; THOMPSON, M. T.; MOSS, F.; PORTAELS, E. P.; GREEN, J.; HERMON-TALOR; McFADDEN, J. J. DNA probes demonstrate a single highly conserved strain of *Mycobacterium avium* infecting AIDS patients. **Lancet**, 1: 65-68, 1989.
- HANCE, A. J.; GRANDCHAMP, B.; LÉVY-FRÉBAULT, V.; LECOSSIER, D.; RAUZIER, J.; BOCART, D.; GICQUEL, B. Detection and identification of mycobacteria by amplification of micobacterial DNA. **Mol. Microbiol.**, 3(7): 843-849, 1989.
- HELLYER, T. J.; DESJARDIN, L. E.; ASSAF, M. K.; BATES, J. H.; CAVE, M. D.; EISENACH, K. D. Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J. Clin. Microbiol.** 34(11): 2843-2846, 1996.

- HERMANS, P. W.; SCHUITEMA, A. R.; SOOLINGEN, D. V.; VERSTYNNEN, C. P.; BIK, E. M.; KOLK, A. H.; VAN EMBDEN, J. D. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, 28(6): 1204-1213, 1990 (a).
- HERMANS, P. W. M.; SOOLINGEN, D.; DALE, J. W.; SCHUITEMA, A. R. J.; McADAM, R. A.; CATTY, D.; VAN EMBDEN, J. D. A. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, 28(9): 2051-2058, 1990 (b).
- HERMANS, P. W. M.; VAN SOOLINGEN, D.; BIK, E. M.; DE HAAS, P. E. W.; DALE, J. W.; VAN EMBDEN, J. D. A. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **Infect. Immun.**, 59: 2695-2705, 1991.
- HERMANS, P. W. M.; MESSADI, F.; GUEBREXABHER, H.; VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E. W.; HEERSMA, H.; NEELING, H.; AYOUB, A.; PORTAELS, F.; FROIMMEL, D.; ZRIBI, M.; VAN EMBDEN, D. A. Analysis of population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. **J. Infect. dis.**, 171:1504-1513, 1995.
- HERRERA, E. A.; SEGOVIA, M. Evaluation of *mpt40* genomic fragment amplification for specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 1108-1113, 1996.
- HEWITT, J.; COATES, A. R. M.; MITCHISON, D. A.; IVANYI, J. The use of murine monoclonal antibodies without purification of antigen in the serodiagnosis of tuberculosis. **J. Immunol. Methods**, 55: 205-211, 1982.
- HIJJAR, M. A. Epidemiologia da tuberculose no Brasil. **Informe epidemiológico do SUS**, Nov.: 53-87, 1992.
- HOBBY, G. L.; HOLMAN, A. P.; ISEMAN, M. D.; JONES, J. M. Immuneration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. **Antimicrob. Agents Chemotherap.**, 4: 94-104, 1973.
- HUEBNER, R. E.; GOOD, R. C.; TOKARS, J. I. - Current Practices in Mycobacteriology. **J. Clin. Microbiol.**, 31 (4): 771-775, 1993.
- HUYGEN, K.; CONTENT, J.; DENIS, O.; MONTGOMERY, D. L.; YAWMAN, A. M.; DECK, R. R.; DeWITT, C. M.; ORME, I. M.; BALDWIN, S.; D'SOUZA, C.; DROWART, A.; LOZES, E.; VANDENBUSSCHE, P.; VAN VOOREN, J.P.; LIU,

- M. A.; ULMER, J. B. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. **Nat. Med.**, 2:893-898, 1996.
- JACKETT, P. S.; BOTHAMLEY, G. H.; BATRA, H. V.; MISTRY, A.; YOUNG, D. B.; IVANYI, J. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 2313-2318, 1988.
- JOINT INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis control. **Tubercle**, 63: 157-169, 1982.
- JONAS, V.; ALDEN, M. J.; CURRY, J. I.; KAMISANGO, K.; KNOTT, C. A.; LANKFORD, R.; WOLFE, J. M.; MOORE, D. F. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 2410-2416, 1993.
- KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KOLK, A.; KUIJPER, S.; VAN EMBDEN, J. D. A. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and tuberculosis control. 1994 (submetido á publicação)
- KAUFMANN, S. H. E.; VAN EMBDEN, J. D. A. Tuberculosis: a neglected disease strikes back. **T. Microbiol.**, 1: 2-5, 1993.
- KENT, L.; McHUGHT, T. D.; BILLINGTON, O.; DALE, J. W.; GILLESPIE, S. H. Demonstration of homology between IS6110 and *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 2290-2293, 1995.
- KOCAGÖZ, T.; YILMAZ, E.; ÖZKARA, S.; KOCAGÖZ, S.; HAYRAN, M.; SACHEDEVA, M.; CHAMBERS, H. F. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 1435-1438, 1993.
- KOLK, A. H. J.; NOORDHOEK, G. T.; DE LEEUW, O.; KUIJPER, S.; VAN EMBDEN, J. D. A. *Mycobacterium smegmatis* strain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 1354-1356, 1994.
- KONEMAN, E. S.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERG, P. C.; WINN Jr., W. C. Diagnostic Microbiology. **J. B. Lippincott**, Philadelphia, 1992.
- KOX, L. F. F.; RHIENTHONG, D.; MIRANDA, M.; UDOMSANTISUK, N.; ELLIS, K.; VAN LEEUWEN, J.; VAN HEUSDEN, S.; KUIJPER, S.; KOLK, H. J. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 672-678, 1994.

- KOX, L. F. F.; RHIENTHONG, D.; MIRANDA, A. M.; UDOMSANTISUK, N.; ELLIS, K.; VAN LEEUWEN, J.; VAN HEUSDEN, S.; KUIJPER, S.; KOLK, H. J. A More Reliable PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 672-678, 1996.
- KRAMBOVITIS, E. An investigation of immunodiagnostic methods for tuberculosis in humans. Ph.D. thesis, University of London, p 142. 1985.
- KUBICA, G. P.; KENT, P. T. The sputum digestion process in the mycobacteriology laboratory: contributions of centrifugal - efficiency and digestant toxicity. **CDC, Proceedings on Laboratory of Mycobacteriology**, 1985.
- KULSKI, J. K.; PRYCE, T. Preparation of mycobacterial DNA from blood culture fluids by simple alkali wash and heat lysis method for PCR detection. **J. Clin. Microbiol.**, 34(8): 1985-1991, 1996.
- KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, 339: 237-238, 1989.
- LEVY, H.; FELDMAN, C.; SACHO, H.; MEULEN, H.; KALLENBACH, J.; KOORNHOF, H. A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Chest.**, 95: 1193-1197, 1989.
- LIBRE, J. M.; TOR, J.; MANTEROLA, J. M.; CARBONELL, C.; ROSET, J. Risk stratification for dissemination of tuberculosis in HIV-infected patients. **Quart. J. Med.**, 82 (298): 149-157, 1992.
- LONGO, M. C.; BERNINGER, M. S.; HARTLEY, J. L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. **Gene**, 93: 125-128, 1990.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual.**, New York: Cold Spring Harbor, 545 p., 1982.
- MANJUNATH, N.; SHANKAR, P. RAJAN, L.; BHARGAVA, A.; SALULA, S.; SHIRINIWAS. Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. **Tubercle**, 72: 21-27, 1991.
- MARCH, F.; COLL, P.; COSTA, R.; RODRIGUEZ, P.; MORENO, C.; GARRIGO, M. PRATS, G. Usefulness of DR, PGRS, and spoligotyping in the typing of *Mycobacterium tuberculosis*. Comparison with IS6110. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, 14:160-166, 1996.

- MARIANI, F.; PICCOLELLA, E.; COLIZZI, V.; RAPPUOLI, R.; GROSS, R. Characterization of an IS-like element from *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Gen. Microbiol.**, 139: 1767-1772, 1993.
- MAZUREK, G. H.; CAVE, M. D.; EISENACH, K. D.; WALLACE Jr., R. J.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 2030-2033, 1991.
- McADAM, R. A.; HERMANS, P. W. M.; VAN SOOLINGEN, D.; ZAINUDDIN, Z. F.; CATTY, D.; VAN EMBDEN, J. D. A.; DALE, J. W. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. **Mol. Microbiol.**, 4: 1607-1613, 1990.
- MENDIOLA, M. V.; MARTÍN, C.; OTAL, I.; GICQUEL, B. Analysis of the regions responsible for IS6110 RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. **Res. Microbiol.**, 143: 767-772, 1992.
- MERCIER, B.; GAUCHER, C.; FEUGEAS, O.; MAZURIER, C. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. **Nuc. Acids Res.**, 18: 5908, 1990.
- MIYAZAKI, Y.; KOGA, H.; KOHNO, S.; KAKU, M. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 2228-2232, 1993.
- MOORE, D. F.; CURRY, J. I.; KNOTT, C. A.; JONAS, V. Amplificação of rRNA for assessment of treatment response of pulmonary tuberculosis patients during antimicrobial therapy. **J. Clin. Microbiol.**, 34:1745-1749, 1996.
- MOUIDING, T. Pathogenesis, pathophysiology, and immunology. In: SCHLOSSBERG, D. **Tuberculosis**, second Edition, New York, 14-21, 1989.
- MURRAY, P. J.; ALDOVINI, A.; YOUNG, R. A. Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guerin strains that secrete cytokines. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 93:934-939, 1996.
- NARAIN, J. P.; RAVIGLIONE, M. C.; KOCHI, A. HIV associated tuberculosis in the developing countries: epidemiology and strategies for prevention. **Tub. Lung Dis.**, 73: 311-321, 1992.
- NASH, D. R.; DOUGLAS, J. E. Anergy in active pulmonary tuberculosis: a comparison between positive and negative reactors and an evaluation of 5 TU and 250 TU skin test doses. **Chest**, 77: 32. 1980.

- NOLTE, F. S.; METCHOCK, B.; MCGOWAN Jr., J. E.; EDWARDS, A.; OKWUMABUA, O.; THURMOND, C.; MITCHELL, P. S.; PLIKAYTIS, B.; SHINNICK, T. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 1777-1782, 1993.
- NOORDHOEK, G. T.; KOLK, A. H. J.; BJUNE, G.; CATTY, D.; DALE, J. W.; FINE, P. E. M.; GODFREY-FAUSSETT, P.; CHO, S-N.; SHINNICK, T.; SVENSON, S. B.; WILSON, S.; VAN EMBDEN, J. D. A. Sensivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 277-284, 1994.
- NOORDHOEK, G. T.; EMBDEN, J. D. A.; KOLK, A. H. J. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. **J. of Clin. Microbiol.**, 34:2522-2525, 1996.
- OTAL, I.; MARTIN, C.; VINCENT-LÉVY-FREBAULT, V.; THIERRY, D.; GICQUEL, B. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 1252-1254, 1991.
- PALITTAPONGARNPIM, P.; CHOMYC, S.; FANNING, A.; KUNIMOTO, D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by ligation-mediated polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Res.**, 21: 761-762, 1993 (a).
- PALITTAPONGARNPIM, P.; CHOMYC, S.; FANNING, A.; KUNIMOTO, D. DNA fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **J. Infect. Dis.**, 167: 975-978, 1993 (b).
- PAO, C. C.; LIN, S-S.; WU, S-Y.; JUANG, W-M. The detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured clinical specimens with cloned *Mycobacterium tuberculosis* DNA as probes. **Tubercle**, 69: 27-36, 1988.
- PAO, C.C.; YENT, T. S. B.; YOU, J. B.; MAA, J. S.; FISS, E. H.; CHANG, C. H. Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis*. by DNA Amplification. **J. Clin. Microbiol.**, 28 (9): 1877-80, 1990.
- PATIL, S. A.; GOURIE-DEVI, M.; CHAUDHURI, J. R.; CHANDRAMUKI, A. Identification of antibody responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in the CSF of tuberculous meningitis patients by Western blotting. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, 81: 35-40, 1996.

- PFYFFER, G. E.; KISSLING, P.; WIRTH, R.; WEBER, R. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 918-923, 1994.
- PIERRE, C.; LECOSSIER, D.; BOUSSOUGANT, Y.; BOCART, D.; JOLY, V.; YENI, P.; HANCE, A. J. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 712-717, 1991.
- PIERSIMONI, C.; CALLEGARO, A.; NISTA, D.; BORNIGLIA, S.; CONTI, F.; SANTINI, G.; DE SIO, G. Comparative evaluation of two commercial amplification assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 35 (1): 193-196, 1997.
- PLIKAYTIS, B. B.; CRAWFORD, J. T.; WOODLEY, C. L.; BUTLER, W. R.; EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; SHINNICK, T. M. Rapid, amplification-based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Gen. Microbiol.**, 139: 1537-1542, 1993.
- QUEROL, J. M.; FARGA, M. A.; GRANDA, D.; GIMENO, C.; LOMAS, J. G. The utility of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Clinical Investigations - Chest**, 107(6): 1631-1635, 1995.
- RANADIVE, S. N.; BHATTACHARYA, S.; KALE, M. K.; BHATTACHARYA, A. Humoral immune response in tuberculosis: initial characterization by immunoprecipitation of <sup>125</sup>Iodine labelled antigens and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. **Clin. Exp. Immunol.**, 64: 277-284, 1986.
- REIDER, H. H., G. M. CAUTHEN, A. B. BLOCH, et al. Tuberculosis and the acquired immunodeficiency syndrome Florida. **Arch. Intern. Med.**, 149: 1268, 1989.
- REISS, J.; COOPER, D. N. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human genetic disease. **Hum. Genet.**, 85: 1-8, 1990.
- ROGERS, B. B.; ALBERT, L. C.; HINE, E. A. S.; BUFFONE, J. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. **Am. J. Pathol.**, 136(3): 541-548, 1990.
- ROSS, C.; RAIOS, K.; JACKSON, K.; DWYER, B. Molecular cloning of a highly repeated element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 942-946, 1992.

- ROSS, B. C.; DWYER, B. Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 329-334, 1993.
- ROUILLON, A.; PERDRIZET S.; PARROT, R. Transmission of tubercle bacilli: the effects of chemotherapy. **Tubercle**, 57: 275-99, 1976.
- SAHADEVAN, R.; NARAYANAN, S.; PARAMASIVAN, C. N.; PRABHAKAR, R.; NARAYANAN, P. R. Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 3037-3039, 1995.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491, 1985.
- SAMBROOK, J.; FRITISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**, CSHL. New York, 1989.
- SANTOS, A. R.; MIRANDA, A. B.; LIMA, L. M.; SUFFYS, P. N.; DEGRAVE, W. M. Method for high yield preparation in large and small scale of nucleic acids from mycobacteria. **J. Microbiol. Met.**, 15: 83-94, 1992.
- SAUNDERS, N. A. Analysis of restriction fragment length polymorphisms in the study of bacteria. In: **Genetic Manipulation**, edited by Society for Applied Bacteriology, Society for Applied Bacteriology, 227-244, 1991.
- SAVIC, B.; SJÖBRING, U.; ALUGUPALLI, S.; LARSON, L. Evaluation of polymerase chain reaction, tuberculostearic acid analysis, and direct microscopy for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. **J. Infect. Dis.**, 166: 1177-1180, 1992.
- SBARBARO, J. A. Skin testing in the diagnosis of tuberculosis. **Semin. Respir. Infect.**, 1: 234, 1986.
- SCHLUGER, N. W.; CONDOS, R.; LEWIS, S.; ROM, W. N. Amplification of DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. **The Lancet**, 344: 232-234, 1994 (a).
- SHAH, J. S.; LIU, J.; BUXTON, D.; STONE, B.; NIETUPSKI, R.; OLIVE, D. M.; KING, W.; KLINGER, J. D. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* directly from spiked human sputum by Q-beta replicase-amplified assay. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 322-328, 1995.

- SHANKAR, P.; MANJUNATH, N.; MOHAN, K. K.; PRASAD, K.; BEHARI, M.; SHRINIWAS; AHUJA, G. K. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. **The Lancet**, 337: 5-7, 1991.
- SHAWAR, R. M.; EL-ZAATARI, F. A. K.; NATARAJ, A.; CLARRIDGE, J. E. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization methods. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 61-65, 1993.
- SHOEMAKER, S. A.; FISHER, J. H.; JONES Jr., W. D.; SCOGGIN, C. H. Restriction fragment analysis of chromosomal DNA defines different strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Am. Rev. Resp. Dis.**, 134: 210-213, 1986.
- SILVA, C. L.; SILVA, M. F.; PIETRO, R. C.; LOWRIE, D. B. Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. **Infect. Immun.**, 64:2400-2407, 1996.
- SJÖBRING, U.; MECKLENBURG, M.; ANDERSEN, A. B.; MIORNER, H. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microb.**, 28: 2200-2204, 1990.
- SMALL, P. M.; SCHECTER, G. R.; GOODMAN, P. C.; SANDE, M. A.; CHAISSON, R. E.; HOPEWELL, P. C. Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, 324: 289-294, 1991.
- SMALL, P. M., MOSS, A. Molecular epidemiology and the new tuberculosis. **Infect. Agents Dis.**, 2: 132-138, 1993.
- SMALL, P. M.; McCLENNY, N. B.; SINGH, S. P.; SCHOOLNIK, G. K.; TOMPKINS, L. S.; MICKELSEN, P. A. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 1677-1682, 1993.
- SMALL, P. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. Molecular epidemiology of tuberculosis. **Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control**, edited by Bloom, B. R., Washington: American Society for Microbiology, p. 569-582, 1994.
- SOINI, H.; AGHA, S. A.; EL-FIKY, A.; VILJANEN, M. K. Comparison of amplicor and 32-kilodalton PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 1829-1830, 1996.

- SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, 98: 503-517, 1975.
- STARR, L.; QUARANTA, V. An efficient and reliable methods for cloning PCR amplification products: a survey of point mutation in intergrin cDNA. **BioTechniques**, 13(4): 612-618, 1992.
- STEAD, W. W.; DUTT, A. K. Epidemiology and host factors. In: SCHLOSSBERG, D. **Tuberculosis**, 2. ed., New York, 1-12, 1989.
- STYBLO, K.; ROUILLO, A. Estimated global incidence of smear positive pulmonary tuberculosis. Unreliability of officially reported figures on tuberculosis. **Bull. Int. Union Tubercle**, 56: 118-125, 1981.
- TABET, S. R.; GOLDBAUM, G. M.; HOOTON, T. M.; EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; NOLAN, C. M. Restriction fragment length polymorphism analysis detection a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with human immunodeficiency virus. **J. Infect. Dis.**, 169: 189-192, 1994.
- TAKAHASHI, M.; KAZUMI, Y.; FUKASAWA, Y.; HIRANO, K.; MORI, T.; DALE, J. W.; ABE, C. Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Microbiol. Immunol.**, 37: 289-294, 1993.
- TAKASHIMA, T.; UETA, C.; TSUYUGUCHI, I.; KISHIMOTO, S. Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. **Infect. Immun.**, 58: 3286-329, 1990.
- TASCON, R. E.; COLSTON, M. J.; RAGNO, S.; STAVROPOULOS, E.; GREGORY, D.; LOWRIE, D. B. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. **Nat. Med.**, 2:888-892, 1996.
- THIERRY, D.; BRISSON-NOEL, A.; VINCENT-LEVY-FREBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, JL.; GICQUEL, G. Characterization of a mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS 6110, and its application in Diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, 28 (12): 2668-2673, 1990.
- TREWICK, S. A.; DAERDEN, P. PCR-based detection of Mycobacteria in sputum samples using a simple and reliable DNA extraction protocol. **BioTechniques**, 17: 844-855, 1994.
- VAN EMBDEN, J. D. A.; VAN SOOLINGEN, D.; SMALL, P. M.; HERMANS, P. W. M. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. **Res. Microbiol.**, 143: 385-391, 1992.

- VAN EMBDEN, J. D. A.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J. T.; DALE, J. W.; EISENACH, K. D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P. W. M.; MARTIN, C.; McADAM, R.; SHINNICK, T. M.; SMALL, P. M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 406-409, 1993.
- VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; DE HASS, P. E. W.; SOLL, D. R.; VAN EMBDEN, J. D. A. The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of IS-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 2578-2586, 1991.
- VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; DE HAAS, P. E. W.; VAN EMBDEN, J. D. A. Insertion element IS1081 - associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 1772-1777, 1992.
- VAN SOOLINGEN, D.; DE HASS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; GROENEN, P. M. A.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 1987-1995, 1993.
- VAN SOOLINGEN, D.; DE HASS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. **Methods in Enzymology**, 235: 196-204, 1994 (a).
- VAN SOOLINGEN, D.; DE HASS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. **RFLP analysis of mycobacteria**. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands, 1994 (b).
- VAN SOOLINGEN, D.; QIAN, L.; DE HASS, P. E. W.; DOUGLAS, J. T.; TRAORE, H.; PORTAELS, F.; QING, H. Z.; ENKHSAIKAN, D.; NYMADAWA, P.; VAN EMBDEN, J. D. A. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. **J. Clin. Microbiol.**, 33(12): 3234-3238, 1995.
- VANNIER, A. N.; TARRAND, J. J.; MURRAY, P. R. Mycobacterial cross contamination during radiometric culturing. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 1867-1868, 1988.
- VERINGA, E.; VAN HARSELAAAR, B.; HERMANS, P. Polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in a clinical microbiology laboratory. **J. Microbiol. Methods**, 16: 139-147, 1992.

- VICTOR, T.; DU TOIT, R.; VAN HELDEN, P. D. Purification of sputum samples through sucrose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 1514-1517, 1992.
- VOGELSTEIN, B.; GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, 76: 615-619, 1979.
- WALLIS, R. S.; ALDE, S. L. M.; HAVLIR, D. V.; AMIR-TAHMASSEB, M. H.; DANIEL, T. M.; ELLNER, J. J. Identification of antigens of *Mycobacterium tuberculosis* using human monoclonal antibodies. **J. Clin. Invest.**, 84: 214-219, 1989.
- WEIL, A.; PLIKATIS, B. B.; BUTLER, W. R.; WOODLEY, C. L.; SHINNICK, T. M. The *mpt40* gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, 34(9): 2309-2311, 1996.
- W. H. O. Tuberculosis notification update. Tuberculosis programe. **W. H. O. /tuberc.**, 175: 1-26, 1994.
- WILKINS, E. G. L.; IVANYL, J. Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. **Lancet**, 336: 641-644, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18: 6531-6535, 1990.
- WILKINSON, R. J.; HASLOV, K.; RAPPUOLI, R.; GIOVANNONI, F.; NARAYANAN, P. R.; DESAI, C. R.; VORDERMEIER, H. M.; PAULSEN, J.; PASVOL, G.; IVANYL, J.; SINGH, M. Evaluation of the recombinant 38 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential immunodiagnostic reagent. **J. Clin. Microbiol.** 35(3): 553-557, 1997.
- WILSON, S. M.; McNERNEY, R.; NYE, P. M.; GODFREY-FAUSSETT, P. D.; STOKER, N. G.; VOLLER, A. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 776-782, 1993 (a).
- WILSON, S. M.; NAVA, E.; MORALES, A.; GODFREY-FAUSSETT, P.; GILLESPIE, S.; ANDERSON, N. Simplification of the polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in the tropics. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 87: 177-180, 1993 (b).
- YANG, Z. H.; DE HASS, P. E. W.; VAN SOOLINGEN, D.; VAN EMBDEN, J. D. A.; ANDERSEN, Å. B. Restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Greenland during 1992:

evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 1994.

YUEN, K. Y.; CHAN, K. S.; CHAN, C. M.; HO, B. S. W.; DAI, L. K.; CHAU, P. Y.; NG, M. H. Use of PCR in routine diagnosis of treated and untreated pulmonary tuberculosis. **Clin. Pathol.**, 46: 318-322, 1993.

ZAINUDDIN, Z. F.; DALE, J. W. Polymorphic repetitive DNA sequences in *Mycobacterium tuberculosis* detected with a gene probe from *Mycobacterium fortuitum* plasmid. **J. Gen. Microbiol.**, 135: 2347-2355, 1989.

ZAMBARDI, G.; ROURE, C.; BOUJAAFAR, N.; FOUQUÉ, B.; FRENEY, J.; FLEURETTE, J. Comparison of three primer sets for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by polymerase chain reaction. **Ann. Biol. Clin.**, 50: 893-897, 1993.

## ANEXO

Cópia do artigo em publicação

ROSSETTI, M. L.; JARDIM, S. B.; RODRIGUES, V. F. S.; MOURA, A. R.; OLIVEIRA, H.; ZAHA, A. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. **Journal of Microbiological Methods** (no prelo)



ELSEVIER

Journal of Microbiological Methods 28 (1997) 139–146

Journal  
of Microbiological  
Methods

## Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix

Maria L.R. Rossetti<sup>a,b</sup>, Susana B. Jardim<sup>b</sup>, Vivian de F.S. Rodrigues<sup>a</sup>, Andréia R. Moura<sup>b</sup>, Hugo Oliveira<sup>c</sup>, Arnaldo Zaha<sup>a,\*</sup>

Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul<sup>a</sup>, Laboratório Central do Rio Grande do Sul<sup>b</sup> and Hospital de Clínicas de Porto Alegre<sup>c</sup>, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Received 7 October 1996; revised 3 January 1997; accepted 7 January 1997

### Abstract

A glass matrix was used to purify *Mycobacterium tuberculosis* DNA from clinical samples before amplification by polymerase chain reaction (PCR). The procedure was established by analysing a subset of 130 clinical samples (70 from patients with tuberculosis and 60 from patients without tuberculosis). The clinical samples included sputum, urine, cerebrospinal fluid, blood and serum. The total number of samples positive by PCR before the glass matrix step was 33 and after the glass matrix step was 58, showing that this purification step improved markedly the detection of *M. tuberculosis* DNA. The detection limit of the amplified DNA in agarose gels stained with ethidium bromide was 10 CFU for serum and cerebrospinal fluid and 50 CFU for sputum. Once established, the procedure was used in the analysis of 179 additional samples from 133 patients suspected of tuberculosis. In general there was an agreement between the results of PCR and clinical diagnosis for tuberculosis. In the case of sputum samples it was possible to compare the PCR and culture results. When considering all the sputum samples analysed, in general the PCR was slightly less sensitive than the culture test. However, when applied to the analysis of samples from patients suspected of tuberculosis, six samples that were culture negative were positive by PCR. Considering the confirmed results of all clinical samples analysed, the sensitivity of the method described in this work (97.4%) was much higher than culture test (45.5%). This difference was mainly due to the low sensitivity of culture test in cerebrospinal fluid, serum and blood samples. The results presented in this work indicate that the inclusion of the glass matrix step in the preparation of DNA improves the detection of *M. tuberculosis* in clinical samples. © 1997 Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Diagnosis; *Mycobacterium tuberculosis*; Polymerase chain reaction

### 1. Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the most important infectious disease in the world, particularly in developing countries. The conventional methods to detect the infectious agent (direct microscopic detection of the organism in clinical specimens) are of

\*Corresponding author: Arnaldo Zaha, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Caixa Postal 15.005, 91.501-970 Porto Alegre, RS, Brasil. Fax: +55 51 3191079. e-mail: zaha@dna.cbiot.ufrgs.br

low sensitivity or time consuming (detection of mycobacteria by culture can take 3–8 weeks).

The detection of *Mycobacterium* species in biological material by polymerase chain reaction (PCR) has been applied with success [1–5]. Different sequences from *M. tuberculosis* genome have been amplified [5–11] and different amplification and detection protocols have been recently reported aiming at the detection of a small number of mycobacteria [5,12–16]. Special attention has been given to the preparation of clinical specimens from patients for PCR analysis. Several procedures have been reported to prepare the samples [13,16–23], including boiling of the sample to release the DNA, which is then used in the PCR without any further purification [17]; purification of bacteria from sputum samples through a 50% sucrose cushion followed by heating of the samples to release DNA before PCR [18]; sonication in presence of glass beads and lysis by non-ionic detergent and proteinase K treatment [19], and lysis of bacteria in the presence of guanidinium thiocyanate followed by binding of the DNA in silica [13].

Since the sensitivity of PCR is quite dependent on an efficient preparation of the clinical specimens before amplification, we have been working to improve a method to purify the DNA. In this paper we describe a modification of the heating method for releasing DNA from *M. tuberculosis* [17]. The inclusion of a single glass matrix purification step improved the amplification of the *M. tuberculosis* DNA. We have established a protocol analysing 130 clinical specimens (including sputum, cerebrospinal fluid, blood, serum, and urine). Once established, the glass matrix protocol was used to analyse 179 additional clinical specimens. The results were then compared to clinical and bacteriological diagnoses.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Clinical specimens

All clinical specimens used were obtained from Laboratório Central do Rio Grande do Sul (Program for Control of Tuberculosis) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (University Hospital). The samples were prepared for microscopic examination by

Ziehl–Neelsen (ZN) staining. After decontamination with 4% NaOH an aliquot was inoculated in Löwenstein–Jensen (LJ) medium and 500 µl were treated for amplification. A total of 309 samples from 233 patients were analysed (85 sputum, 26 bronchoalveolar lavages fluid (BALF), 70 cerebrospinal fluid (CSF), 36 total blood, 67 serum, 9 pleural fluid, 2 ascitic fluid, 1 pericardium fluid and 13 urine).

A subset of 130 of these samples from 100 patients was used to establish the protocol. The samples were from patients with proven diagnoses of TB (70 samples) and from patients without tuberculosis (60 samples), used as controls.

Another subset of 179 samples from 133 patients suspected of TB was analysed by PCR using exclusively the protocol developed in this work. The samples were collected in the period of 1994–1995. All the results of PCR were compared to clinical and bacteriological diagnoses. The data about clinical and bacteriological diagnoses were made available only after the PCR tests were concluded. The clinical diagnosis for TB was based on the isolation of the *M. tuberculosis* by conventional diagnostic and microbiological methods and therapeutic criteria (clinical suspicion of TB and resolution of the process after treatment for it without other diagnoses).

### 2.2. Preparation of clinical specimens for PCR analysis

An aliquot of 500 µl of clinical specimens was concentrated by centrifugation (12 000 g) for 10 min and washed three times with Tris–EDTA (TE) buffer as described by Kocagöz et al. [17]. The sediment was resuspended in 50 µl of TE and placed in a boiling water bath for 10 min. After centrifugation, 10 µl of the supernatant were used in the PCR assay without any further processing. A portion of the remaining material (30 µl) was mixed with 5 µl of a commercial glass matrix (Sephaglas BandPrep Kit, Pharmacia), shaken gently and incubated for 5 min at room temperature. The mixture was centrifuged at 12 000 rpm for 1 min and the supernatant carefully removed. The glass matrix–DNA pellet was washed with 70% ethanol and centrifuged as above. This step was repeated twice. The glass

matrix–DNA pellet was air-dried for about 10 min, resuspended in 30  $\mu$ l of TE and centrifuged as above. A 10- $\mu$ l portion of the supernatant was removed and used for the PCR assay.

### 2.3. PCR amplification

PCR was performed with primers derived from the IS6110 insertion element sequence [7]. The optimization of PCR was performed with *M. tuberculosis* DNA purified from culture. The amplification reactions were performed in 50  $\mu$ l containing 10 mM Tris–Cl (pH 8.3), 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M each of dATP, dCTP, dTTP and dGTP, 40 pmoles of each primer and 2.5 units of *Taq* DNA polymerase (Cenbiot, UFRGS). The reactions were carried out for 35 cycles of 2 min at 94°C, 2 min at 68°C and 2 min at 72°C in a Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler. Amplified DNA was analysed by electrophoresis in 2% agarose gel.

### 2.4. Determination of the sensitivity of the PCR in DNA of clinical specimens

To determine the sensitivity of the PCR in DNA extracted from clinical specimens and purified by glass matrix, 10-fold serial dilutions of *M. tuberculosis* H37Rv grown in Sauton were made in water and 100  $\mu$ l of each dilution were added to 500  $\mu$ l of clinical sample pool (sputum, CSF and serum). The DNA was extracted and after treatment by Sephaglas, used in the PCR assay. Another equal portion of each dilution was cultured on LJ medium to determine the number of colony forming units (CFU) of *M. tuberculosis*. The same dilution was done in TE to be used as control. The clinical specimens used were previously PCR negative for *M. tuberculosis*.

## 3. Results

### 3.1. Determination of specificity

The specificity of the amplification was determined by testing DNA from 34 *M. tuberculosis* samples and 8 samples containing mycobacteria other than *M. tuberculosis* (*M. avium*, *M. bovis*, *M.*

*scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*). We also tested human, *Escherichia coli* and yeast DNA. Only DNA from *M. tuberculosis* and *M. bovis* gave the expected amplification product of 123 bp. No amplification products were observed in the other samples. PCR products were hybridized to the cloned 123 bp IS6110 fragment. The probe hybridized only with 123 bp amplified *M. tuberculosis* DNA (results not shown).

### 3.2. Amplification of *M. tuberculosis* DNA in clinical specimens using glass matrix

In order to establish a protocol to amplify *M. tuberculosis* DNA from clinical specimens using glass matrix we analysed 130 samples from 100 patients for the presence of *M. tuberculosis* by PCR amplification. Two different procedures were used for preparation of the DNA samples. The first protocol consisted of boiling the specimens to release the DNA [17] that was used in the PCR assay. In the second protocol the released DNA was further purified by glass matrix and then used for amplification by PCR. The results are shown in the Table 1. In general the detection of *M. tuberculosis* by PCR was more efficient when the DNA was treated by glass matrix. This is more easily observed in the sputum and blood samples. Of 46 sputum samples 20 were PCR positive for *M. tuberculosis* when the DNA was obtained by boiling. After purification of the DNA by glass matrix the amplification by PCR was positive in 37 samples. It was possible to detect *M. tuberculosis* DNA in eight out of nine blood samples tested when they were prepared by glass matrix. Before the glass matrix step only four of the blood samples examined were positive by PCR.

### 3.3. Sensitivity of PCR for clinical samples

To determine the detection limit of the PCR in clinical samples, we spiked CSF, serum, sputum pool and TE (control) with *M. tuberculosis* bacteria. DNA was released by heating and purified by glass matrix. The detection limit of the amplified DNA fragment in agarose gels stained with ethidium bromide was 10 CFU when the samples were serum, CSF or TE. In sputum samples the detection limit was 50 CFU.

Table 1  
PCR detection of *M. tuberculosis* in clinical samples before and after glass matrix

Sample	No. of samples	Culture positive	ZN positive	PCR positive	
				Before GM	After GM
1. Group with diagnosis of tuberculosis					
Sputum	46	39	27	20	37
Urine	3	2	0	0	2
Cerebrospinal fluid	3	1	0	1	2
Blood <sup>a</sup>	9	1	0	4	8
Serum <sup>a</sup>	9	0	0	8	9
Total	70	43	27	33	58
2. Group without tuberculosis					
Urine	5	0	n.t.	0	0
Cerebrospinal fluid	13	0	n.t.	0	0
Blood	21	0	n.t.	0	0
Serum	21	0	n.t.	0	0
Total	60	0		0	0

GM, glass matrix, ZN, Ziehl–Neelsen, PCR, polymerase chain reaction.

<sup>a</sup> The serum and blood samples were from the same patients. They had previous diagnoses of pulmonary tuberculosis by culture positive sputum.

n.t., not tested

### 3.4. Clinical utility of the established protocol in the diagnosis of TB

The results of the analysis of 179 additional samples from 133 patients suspected of TB are presented in Table 2.

#### 3.4.1. Sputum

From 39 sputum samples, 25 were positive in the PCR test. Of these, 19 were positive and 6 (two samples from each of three patients) were negative in culture. All samples that were PCR positive derived from patients with diagnosis of pulmonary TB. Of the 14 PCR negative samples, ten were negative and four positive in culture. Two of the culture positive samples were identified as *M. avium* and two as *M. tuberculosis*.

#### 3.4.2. BALF

Twenty-six BALF samples were analysed. Of these, six samples were positive in the PCR analysis. Three of them were culture positive, two were negative and the other sample was not tested. These patients received treatment for TB based on clinical data. From the remaining 20 samples that were

negative in the PCR, 19 were also negative in culture and one was not tested.

#### 3.4.3. CSF

We analysed 54 CSF samples. From these, only three were PCR and culture positive. Eleven samples were PCR positive and culture negative. These samples were from ten patients that received treatment for TB and from one without any information about treatment. From the 40 samples PCR negative, 39 were also negative in culture tests. One sample was not analysed by culture.

#### 3.4.4. Blood

Six blood samples were also analysed. Four of them were PCR positive. Of these, only one was culture positive. Two samples negative in culture tests were from patients with diagnosis of pulmonary TB (they had positive culture results in sputum specimens). The other two patients with samples positive by PCR received treatment for TB.

#### 3.4.5. Serum

Thirty-seven serum samples were also analysed. Twenty-one were PCR positive. Of these, 19 were culture negative and two were not tested. All patients

Table 2  
Comparison between PCR, culture tests and clinical data from patients suspected of tuberculosis

Sample	No. of samples	PCR		Culture			Diagnosis of TB		
		Pos	Neg	Pos	Neg	n.t.	Pos	Neg	n.k.
Sputum	39	<u>25</u>		<u>19</u>			<u>19</u>		
			14		<u>6</u>		<u>6</u>		
				4	10		0	9	1
Bronchoalveolar lavage fluid	26	<u>6</u>		<u>3</u>			<u>2</u>	2	
					<u>2</u>		<u>3</u>		
			20			1	<u>2</u>		
					19		1		7
Cerebrospinal fluid	54	<u>14</u>		<u>3</u>			<u>3</u>		
			40		<u>11</u>		<u>10</u>		<u>1</u>
Blood	6	<u>4</u>		<u>1</u>	<u>3</u>	1	<u>4</u>		
			2		2		1		1
Serum	37	<u>21</u>			<u>19</u>	2	<u>21</u>		
			16		16			12	4
Pleural fluid	9	<u>5</u>		<u>3</u>			<u>3</u>		
			4		<u>2</u>			<u>1</u>	<u>1</u>
					3	1		4	
Ascitic fluid	2	<u>2</u>		<u>1</u>			<u>2</u>		
					<u>1</u>				
Pericardium fluid	1	<u>1</u>		<u>1</u>			<u>1</u>		
Urine	5	<u>2</u>		<u>2</u>			<u>2</u>		
			3		3			1	2
Total	179	80	99	37	136	6	80	81	18

n.t., not tested.

n.k., not known.

The number of samples that were PCR positive are underlined.

with PCR positive samples had diagnosis of pulmonary or extrapulmonary TB (They were HIV positive and had positive culture results for sputum, urine or faeces samples). There was no culture information for two other samples that were positive by PCR. These two patients were treated for TB based on clinical diagnosis. Sixteen samples negative by PCR were also negative by culture tests.

#### 3.4.6. Serous effusions

From the nine pleural fluid samples analysed, three were PCR and culture positive, two were positive only by PCR. Of the four samples that were PCR negative, three were also culture negative and one was not tested. The only pericardium fluid sample analysed was positive in both culture and PCR tests. Both ascitic fluid samples analysed were positive by PCR. Of these, one was positive and

other negative in culture (the sample was from a patient that received treatment for TB).

#### 3.4.7. Urine

Five urine samples were also analysed. Two of them were PCR and culture positive and three were negative in both tests.

To compare the sensitivity and specificity of the culture test and the glass matrix-PCR method we analysed the confirmed results presented in Table 2. The samples with no culture test and/or no clinical diagnosis information were not considered in the analysis. The results show that the glass matrix-PCR method presents a higher sensitivity and specificity than the culture test (Table 3). The difference in the sensitivity between both tests is mainly due to the low sensitivity of culture test in cerebrospinal fluid, serum and blood samples, which corresponded to

Table 3  
Comparison of sensitivity and specificity of culture and glass matrix-PCR (GM-PCR) test in the confirmed results

Type of test and result	No. of confirmed TB results		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Positive	Negative		
<i>Culture</i>				
Positive	35	2	45.5	97.5
Negative	42	79		
<i>GM-PCR</i>				
Positive	75	1	97.4	98.8
Negative	2	80		

The confirmed results were from Table 2. The samples with no culture test and/or no clinical diagnosis information were not considered in the analysis.

about 55.7% of the number of samples with confirmed diagnosis for TB.

The estimated costs of the reagents for 10 samples are US\$ 5.00 for culture and US\$ 13.00 for glass matrix-PCR.

#### 4. Discussion

In this paper we report on the detection of *M. tuberculosis* by PCR in different sets of samples using IS6110-derived primers. The detection of the amplified DNA has been improved by using glass matrix to purify the DNA before the amplification procedure. The IS6110-derived primers were chosen because of the higher sensitivity compared to other *M. tuberculosis* sequences [22,7].

Our results showed that the amplification of *M. tuberculosis* DNA of the different samples was possible after the release of the DNA by boiling. However, in general the sensitivity was higher when the DNA was further purified by glass matrix. The glass matrix used in the present work is based on the procedure developed by Vogelstein and Gillespie [29]. In this procedure a chaotropic salt is used for binding of the DNA to the glass matrix and denaturing the proteins present in the solution. The DNA is bound selectively and after washing with a solution containing 70% ethanol it can be eluted in a buffer of low ionic strength. Possible inhibitors of the *Taq* DNA polymerase are removed in this step. In the sputum samples the number of positive results

increased from 20 to 37. In the blood samples the number of positive results increased from 4 to 8. Blood samples have previously been used for amplification by PCR by other authors [24–26]. The analysis of blood samples for the presence of *M. tuberculosis* could be very useful in cases from which it is difficult to obtain another kind of clinical material. The amplification of material from urine samples was possible only when the DNA was purified by glass matrix. Possibly this was due to the presence of inhibitors that were removed by glass matrix extraction. In the case of sputum samples the PCR was slightly less sensitive than the culture test. It is possible that some inhibitors of *Taq* DNA polymerase still remain in the DNA preparation after the glass matrix step. We also amplified *M. tuberculosis* DNA from sera of patients with diagnosis of pulmonary or extrapulmonary TB. Probably the amplification was possible because of the peripheral blood leucocytes that remain in the serum after separation from total blood by slow centrifugation. However, a detailed study has to be done to examine if it is possible to detect *M. tuberculosis* in all different clinical presentations of TB and also to determine for how long clinically cured persons would still have a PCR positive result when serum samples are examined.

The analysis of the PCR sensitivity in artificially contaminated clinical samples showed that the sensitivity is at least 5 times higher in CSF and serum than in sputum. These data reinforced the suggestion that possible inhibitors were not completely removed by the glass matrix purification step.

When applied in the analysis of samples from patients with suspected TB, the PCR results showed more true-positive and true-negative results compared to the microbiological test in sputum clinical specimens. By using PCR it was possible to detect 25 of the 29 cases of pulmonary TB while by culturing only, 23 were positive (two cases were *M. avium*). Two samples gave false-negative results (PCR negative and culture positive). The presence of inhibitors of the *Taq* DNA polymerase could be an explanation for these results. In the case of BALF all six PCR positive samples were from patients that after receiving a trial treatment for TB showed improvement in their clinical status. The six samples can be considered true positive. It is known that

acid-fast organisms are seen on a smear of CSF samples in only 10–20% of patients and that culture tests show a sensitivity between 55 and 80% [27]. However, given the severity of tuberculosis meningitis, the PCR can be very important because it can help to reach a rapid diagnosis. Among 14 PCR positive samples only three gave positive results in culture. Of the remaining 11 samples, three were collected from the same patient in a period of three days (the patient improved after trial treatment). Two samples were from HIV positive patients with PCR positive in blood samples. Five samples were from patients that improved after receiving a trial treatment. One sample was from a patient without any information about treatment for TB. From these data, 13 samples can be considered true positive. The sensitivity of the blood culture test is also known to be low (33%) [28]. Of six samples analysed in this work, four were PCR positive and only one was culture positive. Of the samples that were positive in PCR but negative in culture, two were from the patients with CSF positive samples discussed above. The other sample was from a patient that received treatment and showed clinical improvement. All 21 serum samples that were positive by PCR were negative in culture tests. Nineteen samples were from patients who had culture positive in other kinds of samples. Two samples were from patients with chronic TB. All 21 samples can be considered true positive. Of the five pleural fluid samples positive by PCR, two were negative in culture. One was from a patient who showed positive PCR results in pericardium fluid and the other was from a patient with diagnosis of cancer. The result of this sample could be considered a false-positive. The urine and pericardium samples analysed showed the same results by PCR and culture. The ascitic fluid sample that was PCR positive and culture negative were from a patient who improved after treatment.

The results presented in this work show that the purification of the DNA by glass matrix improved the detection of *M. tuberculosis* in clinical samples. Possibly this step is important to remove components that inhibit the *Taq* DNA polymerase. The procedure could be useful in the analysis of clinical samples that present problems of *Taq* DNA polymerase inhibition and samples that present low sensitivity in culture tests.

The costs of the reagents for the GM–PCR test are 2.6 times that for culture tests. However, considering the shorter time to obtaining the results and also the advantage in the analysis of certain types of clinical samples, this extra cost would be well justified.

## Acknowledgments

We would like to thank Prof. João Carlos Prolla and Prof. Jan Van Embden for helpful discussions, suggestions and critical reading of the manuscript. M.L.R.R. is a recipient of a predoctoral fellowship from CNPq. V.F.S.R. is a recipient of a fellowship from RHAEC-CNPq. This work was supported by FAPERGS.

## References

- [1] Nolte, F.S., Metchock, B., McGowan Jr., J.E., Edwards, A., Okwumabua, O. Thurmond, C., Mitchell, P.S., Plikaytis, B. and Shinnick, T. (1993) Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1777–1782.
- [2] Shankar, P., Manjunath, N., Mohan, K.K., Prasad, K., Shrinivas, M.B. and Ahuja, G.K. (1991) Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* 337, 5–7.
- [3] Querol, J.M., Farga, M.A., Granda, D., Gimeno, C., and García-de-Lomas, J. (1995) The utility of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 107, 1631–1635.
- [4] Kulski, J.K., Khinsoe, C., Pryce, T., and Christiansen, K. (1995) Use of a multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 33, 668–674.
- [5] Shah, J.S., Liu, J., Buxton, D., Hendricks, A., Robinson, L., Radcliffe, G., King, W., Lane, D., Olive, D.M. and Klinger, J.D. (1995) Q-Beta replicase-amplified assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* directly from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1435–1441.
- [6] Hance, A.J., Grandchamp, B., Lévy-Frèbault, V., Lecossier, D., Raugier, J., Bocart, D. and Gicquel, B. (1989). Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.* 3, 843–849.
- [7] Eisenach, K.D.; Cave, M.D., Bates, J.H. and Crawford, J.T. (1990) Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Inf. Dis.* 161, 977–981.
- [8] Portillo, P.D., Murillo, L.A. and Patarroyo, M.E (1991). Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2163–2168.

- [9] Böddinghaus, B.; Rogall T., Flohr, T., Blöcker, H. and Böttger, E. (1990) Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1751–1759.
- [10] Jonas, V., Alden, M.J., Curry, J.I., Kamisango, K., Knott, C.A., Lankford, R., Wolfe, J.M. and Moore, D.F. (1993). Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2410–2416.
- [11] Bodmer, T., Gurtner, A., Schopfer, K. and Matter, L. (1994) Screening of respiratory tract specimens for the presence of *Mycobacterium tuberculosis* by using the gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1483–1487.
- [12] Pierre, C., Lecossier, D., Boussougant, Y., Bocart, D., Joly, V., Yeni, P. and Hance, A.J. (1991) Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J. Clin. Microbiol.* 29, 712–717.
- [13] Wilson, S.M., Mcnerney, R. Nye, P.M. Godfrey-Faussett, P.D., Stoker, N.G and Voller, A. (1993) Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 776–782.
- [14] Miyazaki, Y., Koga, H., Kohno, S. and Kaku, M. (1993) Nested Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2228–2232.
- [15] Ross, B.C. and Dwyer, B. (1993) Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 329–334.
- [16] Cho, S.-N., Van der Vliet, G.M.E., Park, S., Baik, S.-H., Kim, S.-K., Chong, Y., Kolk, A.H.J., Klatser, P.R. and Kim, J.-D. (1995) Colorimetric microwell plate hybridization assay for detection of amplified *Mycobacterium tuberculosis* DNA from sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 33, 752–754.
- [17] Kocagöz, T., Yilmaz, E., Özkara, S., Köcagoz, S., Hayran, M., Sachedeva, M. and Chambers, H.F. (1993) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1435–1438.
- [18] Victor, T., du Toit, R. and van Helden, D. (1992) Purification of sputum samples through sucrose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1514–1517.
- [19] Folgueira, L.; Delgado; R., Palenque, E. and Noriega, A.R. (1993). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1019–1021.
- [20] Amicosante, M., Richeldi, L., Trenti, G., Gregorino, P., Campa, M., Bisetti, A. and Saltini, C. (1995) Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin. *J. Clin. Microbiol.* 33, 629–630.
- [21] Abe, C., Hirano, K., Wada, M., Kazumi, Y., Takahashi, M., Fukasawa, Y., Yoshimura, T., Miyagi, C. and Goto, S. (1993) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3270–3274.
- [22] Forbes, B.A. and Hicks, K.E.S. (1993) Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1688–1694.
- [23] Reischl, U., Pulz, M., Ehret, W. and Wolf, H. (1994) PCR-based detection of mycobacteria in sputum samples using a simple and reliable DNA extraction protocol. *Biotechniques* 17, 844–845.
- [24] Kox, L., Rhienthong, D., Miranda, A., Udomsantisuk, N., Ellis, K., van Leeuwen, J., van Heusden, S., Kuijper, S. and Kolk, H. (1996) A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 32, 672–678.
- [25] Schluger, N.W., Condos, R., Lewis, S. and Rom, W.N. (1994) Amplification of DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Lancet* 344, 232–233.
- [26] Condos, R., McClune, A., Rom, W. and Schuger, N. (1996) Peripheral-blood-based PCR assay to identify with active pulmonary tuberculosis. *Lancet* 347, 1082–1085.
- [27] Barrett-Connor, E. (1967) Tuberculous meningitis in adults. *South. Med. J.* 60, 1061–1067.
- [28] Small, P.M., Schecter, G.F., Goodman, P.C., Sande, M.A., Chaisson, R.E. and Hopewell, P.C. (1991) Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 324, 289–294.
- [29] Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 615–619.