

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia de Estado do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO
GÊNERO *Mycobacterium* EMPREGANDO A TÉCNICA DE
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

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

Claudia Giuliano Bica

Orientadores: Dr. DIÓGENES SANTIAGO SANTOS
Dr. LUIZ AUGUSTO BASSO

Porto Alegre, Janeiro/2003

Este trabalho foi realizado no Grupo de Microbiologia Molecular e Funcional, Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos e do Prof. Dr. Luiz Augusto Basso.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABELA.....	5
RESUMO	6
1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1.1 <i>Micobactérias</i>	8
1.1.2 <i>Epidemiologia</i>	10
1.1.3 <i>A doença</i>	12
1.1.4 <i>Diagnóstico</i>	13
1.1.5 <i>Aplicação da PCR para o diagnóstico da tuberculose</i>	19
2 OBJETIVO.....	22
3 MATERIAIS & MÉTODOS.....	22
3.1.1 <i>Culturas</i>	22
3.1.2 <i>Amostras clínicas</i>	23
3.1.3 <i>Isolamento</i>	23
3.1.4 <i>Extração de DNA</i>	23
3.1.5 <i>PCR</i>	24
3.1.6 <i>Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose</i>	25
3.1.7 <i>Alinhamento das seqüências</i>	25
4 ARTIGO	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6 PERSPECTIVAS	32
7 ABSTRACT.....	32
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

Lista de Abreviaturas

Ac - Anticorpo

ADA - Adenosinadeaminase

Ag - Antígeno

Aids – “Acquired Immune Deficiency Syndrome” (Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida)

BAAR - Bacilo Álcool Ácido Resistente

BBL – “Septi-Check AFB System”

BCG - Bacilo de Calmette e Guérin

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DRS - Seqüências Repetidas Diretas

ELISA - “Enzyme-linked immunosorbent assay”

FDA – “Food and Drug Administration”

GLC - Cromatografia Líquida e Gasosa

HIV – “Human Immunodeficiency Virus” (Vírus da Imunodeficiência Humana)

IS – “Insertion Sequence” (Seqüência de Inserção)

LJ - Löwenstein-Jensen

M. - Mycobacterium

MAC – “Mycobacterium avium-intracellulare Complex”

NALC - N-Acetil-L-Cisteína

NaOH - Hidróxido de Sódio

PCR – “Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)

PPD – “Purified Protein Derivative”

RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”

rDNA – “ribosomal DNA” (DNA ribossomal)

rRNA – “ribosomal RNA” (RNA ribossomal)

SPSS – “Statistical Package for the Social Sciences”

UFC - Unidade Formadora de Colônia

WHO – “World Health Organization” (Organização Mundial da Saúde)

Lista de Figuras

- FIGURA 1: ESFREGAÇÃO DE *M. TUBERCULOSIS*. LÂMINA FEITA A PARTIR DE UM ESFREGAÇÃO DE ESCARRO DE UM PACIENTE INFECTADO POR *M. TUBERCULOSIS* (COLORAÇÃO DE ZIEHL-NELSEEN, 1000X). 8
- FIGURA 2: DESENHO ESQUEMÁTICO DA REGIÃO INTERGÊNICA DE *M. TUBERCULOSIS* E *M. AVIUM*. EM *M. TUBERCULOSIS* A REGIÃO INTERGÊNICA APRESENTA CERCA DE 19 PB E EM *M. AVIUM* 34 PB. 27
- FIGURA 3: ALINHAMENTO DE PARTE DAS SEQÜÊNCIAS DOS GENES FABG/G1 E INHA DE *M. AVIUM* (AF002133) E *M. TUBERCULOSIS* (NC000962). OS NUCLEOTÍDEOS SOMBREADOS EM AMARELO CORRESPONDEM AO “PRIMER” INTER5, EM AMARELO, INTERAVI, EM ROSA, INTER3 E EM VERDE, A REGIÃO PROVÁVEL DE ANELAMENTO DO “PRIMER” INTER5. 29
- FIGURA 4: AMPLIFICAÇÃO DE DNA DAS CULTURAS DE MYCOBACTÉRIAS COM OS “PRIMERS” INTER5, INTERAVI E INTER3. M-MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100 PB (GIBCO); TUB-*M. TUBERCULOSIS* ; 1-*M. ABSCESSUS*; 2-*M. AICHIENSE*; 3- *M. AVIUM*; 4-*M. ASIATICUM*; 5-*M. AURUM*; 6-*M. BOVIS*; 7-*M. CHITAE*; 8-*M. CHUBUENSE*; 9-*M. DUVALE*; 10-*M. FLAVESCENS* 11-*M. FORTUITUM*; 12-*M. GASTRI*; 13-*M. GORDONAE*; 14-*M. GORDONAE UREDOTICUM*; 15-*M. INTRACELLULARE*; 16-*M. KANSASII*; 17-*M. LEUTIFLAVUM*; 18-*M. MAGERITENSE*; 19-*M. MARINUM*; 20-*M. NEOAURUM*; 21-*M. NONCHROMOGENICUM*; 22-*M. PARAFORTUITUM*; 23-*M. PEREGRINUM*; 24-*M. PORCINUM*; 25-*M. SCROFULACEUM*; 26-*M. SIMIAE*; 27-*M. SMEGMATIS*; 28-*M. SZULGAE*; 29-*M. TRIVIALE*; 30-*M. VACCAE*; 31-*M. XENOPI*; CA-CONTROLE DA AMPLIFICAÇÃO 31

Lista de Tabela

- TABELA 1: CRONOLOGIA DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO (KONEMANN *ET AL.*, 1992). 14

RESUMO

Entre as doenças causadas por bactérias do gênero *Mycobacterium*, a tuberculose por *M. tuberculosis* é a mais conhecida. O diagnóstico da doença é feito utilizando-se um conjunto de exames que possibilitam a identificação da mesma (WATT, 2000). Contudo, sabe-se que o diagnóstico combinado de microscopia direta e com o posterior isolamento em meio de cultivo é o “padrão-ouro”. A principal desvantagem desse método é que tal bactéria possui um crescimento lento (cerca de 8 semanas). Recentemente, a detecção de doenças através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem proporcionado avanços significativos no diagnóstico. O uso da amplificação específica de genes, para identificar a *M. tuberculosis*, tais como rDNA 16S, IS6110 ou a região intergênica *senX3-regX3*, tem apresentado algumas restrições, ao nível de confiabilidade e sensibilidade, para a aplicação da técnica de PCR. O presente estudo mostra a construção e a aplicação de um novo alvo para a aplicação da PCR no diagnóstico da tuberculose, baseado no ensaio da diferença de organização gênica do operon *plcA, B e C* diferenciando a *M. tuberculosis* das demais micobactérias. Neste trabalho, foram examinadas 273 amostras de pacientes com suspeita de tuberculose, sendo estas submetidas ao estudo comparativo da técnica de PCR versus cultivo (padrão ouro). A PCR amplificou fragmentos de 439pb. Os resultados mostram 93,7% de acurácia para PCR/Cultivo ($p < 0,001$), 93,1% de sensibilidade com intervalo de confiança de 88,7-96,0 e especificidade de 96,4% com intervalo de confiança de 96,4-99,4. O valor da estatística Kappa (k) foi de 0,82 com erro padrão de 0,041, demonstrando um alinhamento quase perfeito para a verificação do grau de concordância entre os testes. Desta forma, o uso desta nova região para a amplificação da PCR se mostra uma importante e confiável ferramenta no diagnóstico específico da tuberculose. Outra região que compreende parte dos genes *mbaA* e *inhA* foi utilizada para diferenciar o Complexo *tuberculosis* do Complexo *avium*. Porém, novos experimentos serão necessários para o emprego desta região como uma ferramenta de diagnóstico.

1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças originadas por bactérias do gênero *Mycobacterium*, a tuberculose é a mais conhecida, sendo causada pelo bacilo da *M. tuberculosis*.

As primeiras descrições anátomo-patológicas da doença aparecem documentadas em 1679 por Delaboé Sylvius em sua Ópera Médica, porém sua causa permanecia ignorada e ainda não se mencionava a possibilidade sobre sua origem infecciosa (BLOOM & MURRAY, 1992).

Embora a tuberculose já fosse conhecida pelos médicos da era de Hipócrates (460 a.C.), a primeira demonstração de que a doença era de fato de origem contagiosa foi feita em 1865 por Jean-Antoine Villemin: ele demonstrou que, quando fluidos de pacientes tuberculosos eram injetados em coelhos, estes desenvolviam tuberculose (McKINNEY et al., 1998 e BROCK, 1999). Até essa época, os conhecimentos sobre a doença eram muito rudimentares, sendo muito confundida com outras enfermidades como: doenças do aparelho respiratório, bronquite, abscessos pulmonares, etc. Este experimento veio a ser confirmado em 1882 por Robert Koch. Ele isolou e caracterizou o agente etiológico da tuberculose como uma bactéria em forma de bastão chamada de bacilo do tubérculo, revolucionando assim a ciência médica (Figura 1) (BLOOM & MURRAY, 1992 e BARNES, 2000).

Somente, com a descoberta do bacilo, em 1882, por Robert Koch e das radiografias de tórax, em 1895, por Roentgen, a doença passou a ser melhor caracterizada e estudada.

Ao longo de sua evolução, a tuberculose atingiu primeiro os animais para depois o homem, provavelmente por uma variante que antecedeu o *M.bovis*. A infecção dos primeiros humanos, possivelmente, foi através da ingestão de carne ou leite contaminados ou por via aérea. Gradualmente, os bacilos de localização preferencialmente pulmonar e transmissão aerógena, com uma virulência atenuada, firmaram-se como microorganismos da espécie humana (VERONESI, 1996).

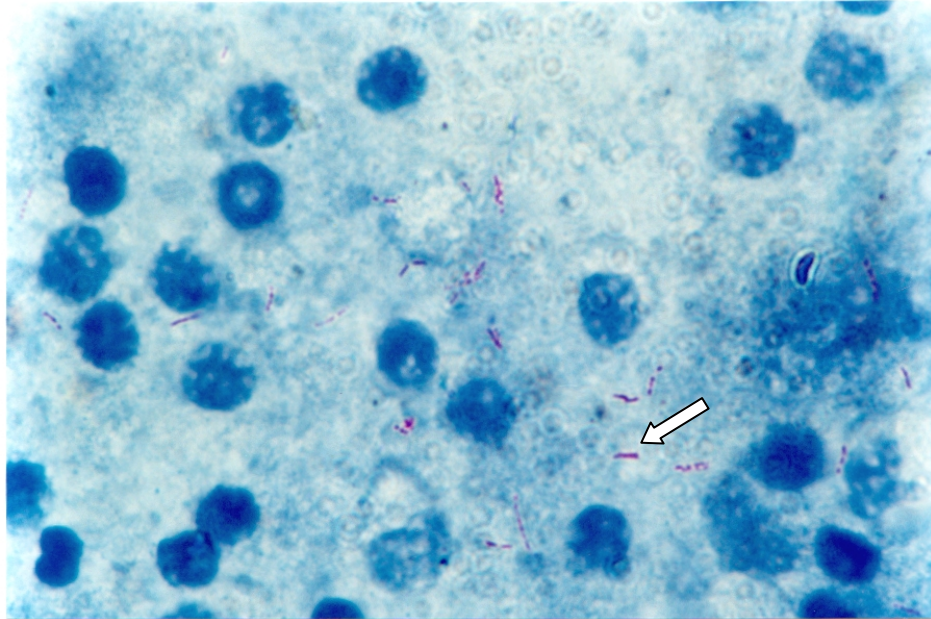


Figura 1: Esfregaço de *M. tuberculosis*. Lâmina feita a partir de um esfregaço de escarro de um paciente infectado por *M. tuberculosis* (coloração de Ziehl-Nelseen, 1000X).

Com o advento da AIDS, a importância das micobacterioses vem crescendo fortemente. Entretanto, não só a tuberculose causada por *M. tuberculosis* se destaca, mas principalmente a causada por micobactérias atípicas, tais como *M. avium*, tem sido responsável por uma grande quantidade de mortes (KRITSKI *et al.*, 1998).

1.1.1 Micobactérias

As espécies de *Mycobacterium* pertencem a um grupo de bactérias de crescimento lento, aeróbicas e álcool-ácido resistentes. O gênero inclui mais de 70 espécies diferentes das quais aproximadamente 30 foram associados com doenças humanas (SHINNICK *et al.*, 1994; KRITSKI, 2000). A espécie patogênica mais importante é a *Mycobacterium tuberculosis*, responsável pela tuberculose. Organismos como os do complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), são oportunistas e freqüentemente infectam pacientes imunossuprimidos (BEGGS *et al.*, 2000). Existem também outras espécies, chamadas atípicas ou micobactérias não

tuberculosas, que foram previamente associados com a doença (WAYNE, 1985; WITEBSKY *et al.*, 1993; PECHÈRE, 1996).

O gênero *Mycobacterium* possui características comuns com os gêneros *Corynebacterium* e *Actinomicetos*, como por exemplo, a produção de ácido micólico e o conteúdo similar de guanina e citosina (WAYNE & KUBICA, 1986; JOKLIK *et al.*, 1992; COLE *et al.*, 1998).

As micobactéria contém particularidades diversas em relação à morfologia das colônias e às características bioquímicas. Entretanto, apresentam algumas propriedades taxonômicas comuns (KRITSKI *et al.*, 2000):

- a) são álcool-ácido resistentes quando expostas à coloração tintorial de Zielh-Neelsen;
- b) capacidade de viver em anaerobiose/dormência (COLE *et al.*, 1998; WAYNE & LIN, 1982; WAYNE & HAYES 1996; LIM *et al.*, 1999 e SMEULDERS *et al.*, 1999);
- c) tempo de crescimento muito lento (20 horas ou mais), em contraste com *Escherichia coli* (30 minutos) (JOKLIK *et al.*, 1992)
- d) as micobactérias possuem uma membrana complexa, rica em ácidos graxos longos (ácidos micólicos), os quais a tornam resistente a diversos antimicrobianos e ao ataque do sistema imunológico;
- e) são patógenos intracelulares;
- f) o conteúdo de guaninas e citosinas no seu ácido desoxirribonucléico (DNA) é, em média, de 65,6% (McKINNEY, 1998; COLE *et al.*, 1998).

As micobactérias podem infectar humanos tanto através dos pulmões quanto pelo trato gastrointestinal. O pulmão é o órgão preferencial de localização e infecção quando se trata de *M. tuberculosis*, mas a infecção pode se disseminar por outras partes do corpo. Quando se trata de micobactérias atípicas, como *M. avium* e *M. kansasii*, a rota de infecção é o trato gastrointestinal e o sistema respiratório (BODMER *et al.*, 2000; VERONESI, 1996).

A micobacteriose causada por *M. avium* constituiu-se na mais debilitante infecção progressiva apresentada por pacientes com AIDS (VERONESI, 1996; DEVALLOIS *et al.*, 1996; HORSBURGH, 1999; BEGGS *et al.*, 2000).

1.1.2 Epidemiologia

Nas últimas décadas o controle da tuberculose foi gradativamente negligenciado pelas políticas públicas, pela sociedade e, até mesmo, pela comunidade científica na falsa ilusão que o problema estaria resolvido ou sob controle. Acrescenta-se a esse fato o aumento progressivo de bacilos multirresistentes aos medicamentos disponíveis no mercado (FIUZA DE MELO, 2002).

O aumento dos índices de tuberculose deve-se as seguintes causas (McKINNEY, 1998; BRUDNEY, *et al.*, 1992; BLOOM & MURRAY, 1992; KONEMAN *et al.*, 1997; BARBAGALLO *et al.*, 2002):

- surgimento da epidemia da Aids/HIV no início dos anos 80, e conseqüente aumento do número de pessoas com imunodepressão suscetíveis à tuberculose e outras micobactérias;
- diminuição do nível sócio-econômico e aumento da pobreza e aglomerados populacionais;
- ausência de programas efetivos contra a tuberculose e sucateamento dos sistemas de saúde.

Porém, o aspecto mais preocupante no ressurgimento da tuberculose, não é somente o aumento do número de casos, mas o tratamento incorreto que tem permitido a emergência de cepas multirresistentes. Isto se dá porque as drogas empregadas isoladamente no tratamento da tuberculose selecionam bacilos resistentes, devendo, por isso, ser administradas sempre em associação. A multirresistência às drogas é uma ameaça ao tratamento (ESPINAL *et al.*, 2000; SUÁREZ *et al.*, 2002).

Por outro lado, a imunodepressão causada principalmente pela Aids/HIV, tem permitido o aparecimento de quadros infecciosos oriundos de bacilos do Complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*) e por micobactérias atípicas, em especial as do Complexo *M. avium* (*M. avium* e *M. intracellulare*) (MURRAY *et al.*, 1995; KONEMAN *et al.*, 1997).

O relatório da WHO (2001) sobre o avanço da tuberculose aponta que um terço da população mundial está contaminada com o bacilo da tuberculose. Das pessoas contaminadas, 10% desenvolverão a doença, o que representa 8 milhões de novos casos por ano. Cerca de 2 milhões de doentes morrem anualmente, 250 mil dos quais são crianças. A maior preocupação da WHO, no entanto, é que o número de pessoas infectadas e de óbitos está aumentando muito nos últimos anos - inclusive nos países ricos - porque o bacilo da *M. tuberculosis* está cada vez mais resistente às drogas conhecidas. Como a tuberculose aproveita a fraqueza do sistema imunológico para atacar o corpo, os aidéticos são suas vítimas potenciais: eles têm chances 30 vezes maiores de contraí-la.

Os objetivos propostos para o controle da tuberculose até 2005 são de 70% de todos os casos de infecção ativa de tuberculose serem diagnosticados e 85% tratados com sucesso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Atualmente, a situação do Brasil nesse quadro não é satisfatória. O País ocupa o 13.º lugar, entre as 22 nações responsáveis por 80% dos casos de tuberculose no mundo. A contribuição do Brasil para a doença é de 68 casos para cada 100.000 habitantes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Os dados da incidência de novos casos da doença no Rio Grande do Sul apontam para uma taxa de 16,6% (para cada 100.000 habitantes no ano de 2000). A região Metropolitana é responsável por 63% dos casos, referente aos 14 municípios de maior índice verificado da doença (KLIEMANN, 2001; RIO GRANDE DO SUL (A), 2001).

Em Porto Alegre, a taxa de incidência é de 105 casos de tuberculose por grupo de 100.000 habitantes, destacando que 70% dos infectados possuem idade entre 20 a 49 anos (CECCON, 2002; RIO GRANDE DO SUL, 2002).

Frente a esse quadro alarmante, a correta identificação do agente etiológico é de vital importância para tratamento e controle da doença.

1.1.3 A doença

A *M. tuberculosis* ativa é expelida por pacientes com tuberculose, geralmente pulmonar, através da fala, espirro e, principalmente pela tosse (JOKLIK *et al.*, 1992). Os indícios clínicos, em uma primeira etapa são: perda de peso, tosse e sudorese noturna. Quando a doença não é tratada, ocorre a formação de abscessos pulmonares e cavidades (LEVINSON & JAWETZ, 2000).

As manifestações clínicas causadas pelas micobactérias do Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), nos pacientes não infectados por HIV, geralmente são respiratórias e assemelham-se às da tuberculose pulmonar causada por *M. tuberculosis*. Porém, em HIV positivos, *M. avium* geralmente multiplica-se em linfonodos localizados e dissemina-se sistematicamente podendo causar bacteremia generalizada (MURRAY *et al.*, 1998). Acredita-se que este microorganismo seja responsável pela maioria das diarréias, mau absorção e perda de nutrientes que são tipicamente observadas em casos avançados de infecção pelo vírus HIV (HORSBURGH *et al.*, 1991; PECHÉRE, 1996).

Já a doença pulmonar causada por *M. bovis* é semelhante ao da *M. tuberculosis*, pois clinicamente, radiologicamente e patologicamente são indistinguíveis. Porém *M. bovis* apresenta uma tendência mais amena de reativar nas pessoas contaminadas e de se propagar (O'REILLY & DABORN, 1995).

Um estudo feito, em 50 pacientes, analisou portadores de AIDS e com suspeita de micobacteriose causada por *M. tuberculosis* disseminada na corrente sanguínea. Usando a cultura a partir de amostras de sangue, observou-se que 71,4% (36) pacientes estudados eram portadores de micobacteriose, sendo que 71,8% (25)

apresentaram *M. tuberculosis* e 28,2% (11) apresentaram *M. avium* (GRINSZTEJN *et al.*, 1997).

1.1.4 Diagnóstico

A reemergência da tuberculose, o aumento do número de pessoas infectadas pelo vírus do HIV, a semelhança dos sintomas clínicos com outras micobacterioses e a demora no diagnóstico (devido ao crescimento lento e a escassa quantidade de bacilos – paucibacilares) faz com que a correta identificação do agente infeccioso, no menor tempo possível, seja de grande importância.

O principal desafio do diagnóstico é ser preciso e ágil na identificação do agente etiológico. Os métodos convencionais continuam sendo usados por muitos laboratórios, entretanto, a rapidez e a sensibilidade das técnicas moleculares para a identificação de *Mycobacterium sp* estão sendo cada vez mais utilizadas.

O avanço tecnológico no diagnóstico da tuberculose pode ser entendido conforme a seguinte citação: “O final da década de 60 representa uma ponte entre o passado e o futuro no diagnóstico laboratorial da tuberculose. Uma ponte entre a abordagem morfológica, fenotípica e bioquímica do passado e as técnicas de detecção direta do bacilo através de anticorpos monoclonais e sondas de DNA ou que utilizam a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)” (KONEMANN *et al.*, 1992). Esta citação está bem ilustrada na TABELA 1, relativa aos grandes avanços ocorridos no campo da tuberculose.

O diagnóstico da tuberculose está baseado, além da avaliação clínica do paciente, nos exames de baciloscopia, teste tuberculínico, radiografia, cultivo e testes bioquímicos (BRASIL, 2000; WATT, 2000). A microscopia direta do BAAR, combinada com o cultivo, constitui a prova “padrão-ouro” para a identificação da *M. tuberculosis*. Contudo, o longo tempo despendido para o seu crescimento (8 semanas aproximadamente) é a principal desvantagem desta técnica (SAVES *et al.*, 2002).

Tabela 1: Cronologia das técnicas de Diagnóstico (KONEMANN *et al.*, 1992).

DATA	EVENTO
1882	Descoberta do bacilo de Koch
1898	Primeiro teste sorológico
1924	Meio de cultivo com ovo, Löwenstein-Jensen (LJ)
1939	Padronização do "purified protein derivative" (PPD)
1963	Cultivo em ágar – Middlebrook
1965	Detecção de anticorpo (Ac) em gel de precipitação
1969	Uso de C ¹⁴ para cultivo de bactérias
1976	ELISA para tuberculose (enzyme-linked immunosorbent assay)
1977	Uso de C ¹⁴ em tuberculose
1978	Detecção de adenosinadeaminase (ADA)
1979	Detecção de escarro por cromatografia líquida e gasosa (GLC)
1981	Sorologia – Hemaglutinação
1982	Detecção no cultivo por GLC
1983	Detecção no líquido por GLC
1983	Detecção de antígeno (Ag)
1983	Inibição do ELISA
1986	Estudo de campo com ELISA
1987	DNA GenProbe para rRNA
1988	Detecção tardia (14 dias de Ag)
1989	Avaliação clínica dos marcadores ADA
1989	Primeiro PCR para tuberculose
1990	Identificação das células secretora Ac anti-BCG
1992	Emprego de luciferase em laboratório

A baciloscopia por ser de execução rápida, fácil e de baixo custo, favorece uma ampla cobertura diagnóstica, identificando a principal fonte de infecção (doentes bacilíferos) e permitindo a pronta atuação na interrupção da cadeia de transmissão (GOTO *et al.*, 1991; KONEMAN *et al.*, 1992; BRASIL, 2000). O teste é feito a partir de um esfregaço de amostra clínica, em lâmina, pelo método de coloração de Ziehl-Neelsen (KRITSKI *et al.*, 1998). Para considerarmos uma

amostra positiva, é necessário um mínimo de 5.000 - 10.000 bacilos por milímetro de escarro (BRASIL, 1994). Devido à baixa sensibilidade deste método (em torno de 40 a 70%), existem muitos casos falso-negativos (STYBLO & ROUILLO, 1981). Outra limitação, é o fato de não podermos distinguir as espécies de micobactéria pelo microscópio (GORDIN & SLUTKIN, 1990; BROOKS *et al.*, 1995).

Dessa forma, somente a baciloscopia não contribui para a definição do resultado de diagnóstico. Além do limite de sensibilidade e de especificidade da técnica, existem amostras paucibacilares e *nontuberculous mycobacteria* (CARMO *et al.*, 2002).

O isolamento de micobactérias em meios de cultivo é um dos métodos mais sensíveis, podendo detectar de 10-100 células viáveis por amostra (BRASIL, 1994). Posteriormente, o cultivo permite posterior identificação da micobactéria isolada, através dos testes bioquímicos padronizados (MURRAY *et al.*, 1998), assim como a realização do teste de sensibilidade, o que não é possível quando se realiza apenas a baciloscopia.

A sensibilidade do cultivo microbiano varia consideravelmente (30-96%) com o material a ser analisado, porém é altamente específico independente do material (LEVY *et al.*, 1989; LIBRE *et al.*, 1992; BLOOM, 1994). Essa metodologia também propicia o diagnóstico nos casos onde a eliminação bacilar não é suficiente para ser detectada pela baciloscopia (BRASIL, 1994). Yajko (1995) determinou que a concentração mínima necessária para amostras clínicas de escarro serem viáveis é a partir de 42 UFC (unidade formadoras de colônias), pois, após o processo de descontaminação com NALC-NaOH (N-Acetil-L-Cisteína e hidróxido de sódio) o número de UFC viáveis reduz para 8.

O cultivo do bacilo no meio usualmente utilizado (LJ) apresenta maior sensibilidade, porém seus resultados demandam tempo (4 a 8 semanas) em virtude das características de crescimento lento das micobactérias. Para reduzir o tempo de crescimento bacteriano, diversos meios de cultivo encontram-se no mercado. O Septi-Check AFB System (BBL) e o "Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) System" (sistema de tubo indicador de crescimento de micobactéria). Estes meios

líquidos permitem a visualização da turvação através da fluorescência, antecipando com isso a leitura dos resultados quando comparado aos meios de crescimento tradicionais como Löwenstein-Jensen (LJ). Já a inoculação de amostras em meios de ágar-base, tais como Middlebrook 7H10 e 7H11, permitem a observação microscópica de microcolônias. O crescimento destas pode ser feito 5 a 7 dias após a inoculação do esfregaço positivo da amostra.

A morfologia das microcolônias pode ser também utilizada para fazer uma “prévia” da identificação de *M. tuberculosis* e *M. avium-intracellulare*. Esta informação muitas vezes pode ajudar a guiar o trabalho para o isolamento.

O exame radiológico é auxiliar no diagnóstico da tuberculose, pois permite a seleção de portadores de imagens sugestivas de tuberculose. Já a prova tuberculínica (Técnica de Mantoux) é um método diagnóstico auxiliar nos indivíduos com sintomas respiratórios, pois nos casos não reativos (teste negativo) podem, em princípio, excluir a tuberculose como causa dos sintomas.

Para conduzir diretamente a um reconhecimento das micobactérias, novas tecnologias estão sendo introduzidas nas rotinas dos laboratórios, que buscam auxiliar na rápida identificação e determinação do perfil do tratamento e da sensibilidade às drogas. Entre estas podemos citar o sistema automatizado radiométrico (BACTEC) que, além de realizar os testes de sensibilidade aos fármacos utilizados no tratamento, faz a diferenciação da *M. tuberculosis* de outras bactérias (HAWKINS, 1986), através do cultivo de micobactérias. O sistema detecta a presença de *M. tuberculosis* indicando as drogas resistentes, reduzindo o tempo de crescimento para 7 dias (no mínimo) de inoculação, dependendo do número de bactérias na amostra (HAVLIR & ELLNER, 1995; MURRAY *et al.*, 1998). A sensibilidade e a especificidade do método é semelhante à obtida pelo cultivo convencional (ABE *et al.*, 1993; BLOOM, 1994). Entretanto, o BACTEC utiliza compostos radioativos e possui custo elevado, restringindo o seu uso a poucos laboratórios.

Tanto a Espectrometria de Massa, a Cromatografia Líquida e Gasosa (GLC) e a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) detectam a maioria das espécies

de micobactérias através de um padrão único de ésteres de ácido micólico, dispostos na membrana. A desvantagem é que tais equipamentos possuem um elevado custo (HEUBNER, *et al.*, 1993).

Apesar dos diferentes métodos diagnósticos, a aplicação prática das técnicas moleculares vem crescendo consideravelmente, pois estas permitem, conforme a metodologia utilizada, detectar e identificar tanto a espécie da micobactéria ou resistência às drogas com precisão e rapidez.

Atualmente, diversas sondas estão sendo comercializadas para a detecção das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*), *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. goodii* (Accu-Probe; Roche Diagnostics, Nutley, NJ; Gen Probe, San Diego, CA. (BODMER *et al.*, 1997; BERGMANN *et al.*, 1996 e 1999)). Estas sondas de DNA, as quais hibridizam com a seqüência do rDNA 16S, tornam a identificação mais rápida da micobactéria na amostra clínica. Entretanto, a aplicação desta técnica tem como principal desvantagem a pouca especificidade, estando aprovada com restrições pela FDA (Food and Drug Administration), devendo ser aplicada somente em pacientes adultos e com BAAR positivo.

A técnica de análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA ou RFLP em micobactérias é baseada na fragmentação do DNA, por meio de enzimas de restrição, e na hibridização desses fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas radioativamente ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência. O método pode ser utilizado para distinguir diferentes espécies de micobactérias, polimorfismos, etc. Entre os diversos autores que buscam a identificação das micobactérias através da técnica de RFLP, incluem os trabalhos de ROTH *et al.*, 2000; WILSON *et al.*, 1998; TAYLOR *et al.*, 1997; DEVALLOIS *et al.*, 1997; LAPPAYAWICHIT *et al.*, 1996 e TELENTI *et al.*, 1993.

Entre as regiões mais utilizadas por essa técnica são: as regiões 16S e 16S-23S (ROTH *et al.*, 2000) do rDNA ou o gene *hsp65* (TELENTI *et al.*, 1993). Entretanto, mesmos nos trabalhos mais promissores, observamos que os autores sugerem, que em alguns casos, se faça o sequenciamento do produto amplificado,

pois a região 16S apresenta grande similaridade entre *M. bovis* e *tuberculosis* (DOBNER *et al.*, 1996), não sendo possível diferenciá-las somente com o RFLP (SANSILA *et al.*, 1998).

No trabalho de Roth *et al.*, (2000), foi demonstrado que as enzimas *HaeIII* e *CfoI*, são capazes de separar algumas espécies de micobactérias, através da técnica de RFPL. Entretanto, essa digestão enzimática identifica somente 39 taxons de micobactérias dos 54 existentes e um de três ou quatro de sete genótipos encontrados em *Mycobacterium intracellulare* e de *Mycobacterium kansasii*, respectivamente. As micobactérias restantes não identificadas, são agrupadas em 5 espécies muito próximas entre si, como por exemplo, o complexo *Mycobacterium avium*. A identificação final do complexo necessita de outras enzimas de restrição como *TaqI*, *MspI*, *DdeI*, ou *Avall*, o que torna a técnica extremamente trabalhosa para ser utilizada em laboratórios de rotina.

Vários trabalhos buscam a identificação de *M. tuberculosis* através da amplificação específica de uma região alvo, contudo ainda não se conseguiu uma região de consenso na comunidade científica. Os trabalhos de KENT *et al.* (1995), HELLYER, *et al.* (1996) e McHUGH *et al.* (1997), GITHUI *et al.* (1999), por exemplo, utilizam a região IS6110, porém é preciso se fazer à hibridização com sondas específicas (RFLP - Restricion Fragment Length Polymorphism) e até mesmo o uso do sequenciamento para a identificação final da *M. tuberculosis*.

A FDA, aprovou a validade do “kit” de PCR “Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test (Gen-Probe, San Diego CA)” para ser utilizado em laboratórios de rotina, com as mesmas restrições descritas para as Sondas de DNA, pois este método identifica amostras de micobactérias, do sistema respiratório.

Recentemente o uso de técnicas de sequenciamento para identificação de espécies de bactérias, vem substituindo os métodos convencionais mencionados acima. A identificação de micobactérias, por sequenciamento, consiste na utilização, de no mínimo, 3 genes alvo: o 16S gene de rDNA (BEGGS *et al.*, 2000; EL AMIN *et al.*, 2000; PATEL *et al.*, 2000), o gene de *hsp65* (RINGUET *et al.*, 1999), e o gene de *recA* (BLACKWOOD *et al.*, 2000; SAVES *et al.*, 2002). O gene 16S rDNA é

altamente conservado, contudo, contém algumas variações em sua seqüência espécie-específicas. Não existem muitas seqüências depositadas nos bancos de seqüências dos genes *hsp65* e *recA*, o que dificulta a diferenciação das espécies de micobactérias. (KIRSCHNER *et al.*, 1993; TORKKO *et al.*, 1998; CLOUD *et al.*, 2002).

Atualmente o sequenciamento do gene 16S do RNA (rDNA) é considerado o método mais satisfatório para identificação de micobactérias. A técnica de sequenciamento, é a forma mais precisa de identificar micobactérias, contudo o custo para a sua aplicação em laboratórios é altamente dispendioso. Esse fato, faz com que esta técnica seja inaceitável para uso em geral, principalmente na prática da rotina laboratorial (ROTH *et al.*, 2000; TORKKO *et al.*, 1998; KIRSCHNER *et al.*, 1993).

1.1.5 Aplicação da PCR para o diagnóstico da tuberculose

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método simples, utilizado para amplificação de uma determinada seqüência nucleotídica de RNA ou DNA a partir de ínfimas quantidades de material biológico.

O uso da PCR, além de apresentar vantagens como rapidez, maior sensibilidade e não necessitar de amostras biologicamente viáveis, pode não só indicar a presença de micobactérias em amostras clínicas, como também a espécie em questão.

Este último aspecto, ou seja, a correta caracterização da espécie, tem assumido um papel de grande importância para o adequado tratamento da doença. Em virtude do aumento de pacientes imunossuprimidos, a incidência de infecções por diversas micobactérias tem sido bastante significativa.

A técnica de PCR, para identificar *M. tuberculosis*, tendo como alvo à região IS6110, é objeto de muitas controvérsias, apesar da sua vasta utilização. KENT *et al.*, (1995), identificaram esta mesma região em outras micobactérias. A mesma conclusão foi encontrada por outros pesquisadores (McHUGH *et al.*, 1997; van

SOOLINGEN, 1993; DZIADEK *et al.*, 2001) que defendem a idéia da falta de especificidade desta região. Eles encontraram reações cruzadas entre micobactérias e a mesma região em outras bactérias. Por outro lado, FUMOKONG *et al.*, (1994), encontraram a seqüência de inserção IS6110, também conhecida como IS986 e IS987, exclusivamente em membros do Complexo *M. tuberculosis*. GITHUI *et al.*, (1999), HELLYER *et al.*, (1996), e **MULCALHY, (1996)** também verificaram que o produto amplificado desta região é específica para o complexo *M. tuberculosis*.

Alguns trabalhos demonstram que cepas de *M. tuberculosis* perdem a seqüência de inserção IS6110 (van SOOLINGEN, 1993; KENT *et al.*, 1995; DZIADEK *et al.*, 2001) podendo gerar falsos resultados negativos quando esta região é utilizada no diagnóstico.

KENT *et al.* (1995) amplificaram uma seqüência de 181 pares de bases (pb) homóloga a região IS6110 do complexo *M. tuberculosis* por nested-PCR em sete de oito *M. fortuitum*, quatro de sete *M. avium intracellulare*, quatro de cinco *M. kansasii*, cinco de cinco *M. xenopi*, dois de quatro *M. malmoense* e dois de dois *M. chelonae*. Eles concluíram que um cuidadoso desenho das seqüências iniciadoras (“primers”) baseados na IS6110 é necessário para evitar reações cruzadas com outras micobactérias. Desta forma, resultados falso-positivos podem ser obtidos para a identificação de *M. tuberculosis* quando alguns métodos baseados na amplificação da IS6110 são empregados.

As conclusões obtidas por KENT *et al.* (1995) foram contestadas por HELLYER *et al.*, (1996). Pois, analisando-se as mesmas amostras do estudo anterior, porém, amplificando regiões diferentes da IS6110, não foi observada reação cruzada com outras micobactérias do complexo *M. tuberculosis* (HELLYER *et al.*, 1996). Também **MULCALHY (1996)** contesta as conclusões obtidas por KENT, pois o mesmo testou 2 diferentes alvos para a região IS6110 (123pb e 317pb), em culturas de *M. tuberculosis* e não encontrou resultados falso-positivos como os relatados por KENT *et al.* (1995).

McHUGH *et al.* (1997) hibridizando uma sonda de 181 pb da IS6110 (KENT *et al.*, 1995) com DNAs de micobactérias, demonstraram que esta região está presente

em múltiplas cópias em outras micobactérias além do complexo *M. tuberculosis*. Estes resultados sugerem que as micobactérias possuem uma família de elementos "IS-like", reforçando assim as conclusões de KENT *et al.* (1995).

Porém, GITHUI *et al.* (1999) em um estudo baseado na técnica de RFLP e hibridização com sonda derivada da IS6110, confirmaram a especificidade para o complexo *M. tuberculosis*. Além disso, a técnica de PCR com "primers" específicos para a IS6110 originaram fragmentos de 181 pb somente para as amostras do complexo. Eles supõem ainda que, provavelmente, os resultados de hibridização obtidos por McHUGH *et al.*, (1997) possam ser devidos a condições de baixa estringência possibilitando hibridizações não-específicas.

Os métodos que se propõem a identificar e diferenciar a *M. tuberculosis* são, em sua maioria, baseados em RFLP. Essa técnica permite a realização da tipagem molecular, onde se procura caracterizar diferentes cepas dentro da mesma espécie para fins epidemiológicos ou de diagnóstico (BURGER *et al.*, 1998). Apesar de trabalhoso, o método baseia-se na amplificação e posterior hibridização de seqüências repetidas diretas (DRS) encontradas no gene *hsp65* "spoligotyping" de micobactérias (DEVALLOIS *et al.*, 1997; KAMERBEEK *et al.*, 1997).

Os trabalhos mais promissores neste sentido são aqueles que analisam regiões hipervariáveis da região promotora do gene da 16S rDNA (DOBNER *et al.* 1996). A amplificação de uma determinada seqüência do gene 16S do rDNA é específica para todos os membros do gênero *Mycobacterium* (DESJARDIM *et al.*, 1996; NINET *et al.*, 1999). Já a amplificação da região entre os genes 16S-23S rDNA, (SANSILA *et al.*, 1998), pode variar entre espécies diferentes de micobactérias, apesar destes genes serem conservados entre elas.

Os protocolos de identificação descritos, que utilizam a PCR, são capazes de identificar e diferenciar os complexos *M. tuberculosis* do complexo *M. avium*. Mas os mesmos não identificam diretamente a *M. tuberculosis* e *M. avium*, por isso propomos o estudo dos genes *fabG* e *inhA* em amostras clínicas para a identificação direta destes patógenos, devido à diferença na estrutura gênica.

A mesma analogia podemos utilizar ao tratar de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Os métodos existentes não diferenciam as espécies dentro de um mesmo complexo (como *M. bovis* e *M. tuberculosis*). BERH *et al.*, (1999) trabalhando com “microarray”, identificaram nove regiões presentes em *M. tuberculosis* e ausentes em *M. bovis*. Analisando os genes presentes nestas regiões, escolhemos o operon do gene *plc* (*plcA*, *plcB* e *plcC*), que codifica uma fosfolipase para a construção de “primers”, para diferenciar a *M. tuberculosis* de *M. bovis* e das demais espécies.

Estudando os métodos existentes atualmente, e revendo os protocolos na busca de um teste de diagnóstico que alie a agilidade, baixo custo, especificidade e sensibilidade é que propomos a utilização de uma nova região de amplificação para a diferenciação do Complexo *M. tuberculosis* do Complexo *M. avium* e a identificação específica da *M. tuberculosis*.

2 OBJETIVO

Considerando-se a importância da necessidade de um diagnóstico laboratorial específico para a tuberculose e o fato do principal método molecular de identificação estar baseado na região de inserção IS6110 é que buscamos um novo alvo, como uma alternativa na diferenciação da *Mycobacterium tuberculosis* das demais micobactérias.

Desta forma, o nosso objetivo foi testar a eficiência dos “primers”, por meio da PCR, utilizando parte dos genes *fabG* e *inhA* para diferenciar os complexos *M. tuberculosis* e *M. avium* e parte dos genes *plcB* e *plcC*, para a identificação da *M. tuberculosis* das demais micobactérias, em amostras clínicas de pacientes com suspeita de tuberculose.

3 MATERIAIS & MÉTODOS

3.1.1 Culturas

Um total de 32 micobactérias utilizada neste trabalho foi obtido do IOC/FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brasil). As espécies das culturas enviadas já haviam

sido identificadas pelo cultivo convencional e testes bioquímicos. Estas incluem a linhagem H37Rv, assim como, outras 31 micobactérias: *M. abscessus*, *M. aichiense*, *M. avium*, *M. asiaticum*, *M. aurum*, *M. bovis*, *M. chitae*, *M. chubuense*, *M. duvale*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. gordonae uredoticum*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. leutiflavum*, *M. mageritense*, *M. marinum*, *M. neoaurum*, *M. nonchromogenicum*, *M. parafortuitum*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgae*, *M. triviale*, *M. vaccae* e *M. xenopi*.

3.1.2 Amostras clínicas

Foram processadas 273 amostras clínicas de escarro obtidas junto ao Complexo Hospitalar da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Hospital Sanatório Partenon e do Núcleo de Doenças Infecciosas do Espírito Santo. Todos os pacientes com suspeita de *M. tuberculosis* foram submetidos ao teste de baciloscopia para a confirmação do BAAR (Bacilo Álcool Ácido Resistente) através do método de coloração de Ziehl-Neelsen com fucsina carbólica (KRISTSKI *et al.*, 2000).

Após a confirmação do bacilo, uma alíquota era selecionada da amostra para a realização da PCR e a outra para ser encaminhada ao laboratório de referência para realizar a prova de cultivo (“padrão ouro”) e posterior identificação bioquímica da espécie (MURRAY *et al.*, 1998; WATT, 2000).

3.1.3 Isolamento

A amostra foi descontaminada, inoculada, isolada e identificada no laboratório de referência para tuberculose, conforme o Manual de Bacteriologia da Tuberculose e pelas Normas Técnicas e Operacionais (BRASIL, 1994; RIO GRANDE DO SUL, 2001).

3.1.4 Extração de DNA

Antes da extração do DNA, as micobactérias foram diluídas em PBS 1X e inativadas pelo calor a 95°C por 10 minutos. Posteriormente, 200 µl desta suspensão

foram adicionadas em um tubo de 1,5 ml contendo 200 µl do tampão de extração. A extração de DNA das alíquotas das amostras clínicas foi feita adicionando-se 100µl da alíquota, 100µl de PBS 1X e 200µl do tampão de extração em tubo de 1,5 ml. Imediatamente as amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos. Depois do tratamento térmico, tanto das culturas quanto das amostras clínicas, foi adicionado proteinase K e a partir desta etapa foi seguido o protocolo de extração de DNA do Kit QuiAmp DNA (Quiagen).

3.1.5 PCR

Os programas Vector NTI version 4.0 (InforMax, Inc.) foram utilizado para projetar os “primers” descritos abaixo, os quais, foram sintetizados pela Invitrogen.

A amplificação de parte do DNA dos genes *plc* foi realizada com os “primers” BC3 (5' TCGACGGCAGAAAGCGTGCC 3') e BC5 (5' GCGGCTCAATGCGCTTCCG 3') resultando em um amplicon de 439 pb. As amplificações foram feitas com 10 µl do DNA da amostra processada em 40 µl da mistura contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10 pmol de cada ‘primers’, e 1,5 U/µl de *Taq* DNA polimerase. As amostras foram incubadas no termociclador a 94°C por 4 min.; 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 65°C por 30 seg. e 72°C por 30 seg.; e 72°C por 4 min.

A PCR multiplex foi realizada com os “primers” senso INTER5 (5' TTCCGAGGATGCGAGCTATATCTCC 3') e INTERAVI (5' CCAGCACACAAGGACATTAAGGACG 3') e o “primer” antisenso INTER3 (5' TTTGCCGGCAGCCGGTCG 3'). Os amplicons esperados são de 258 e 194 pb para a amplificação de parte do DNA de *M. tuberculosis* e *M. avium*, respectivamente. O DNA da cultura extraído (10 µl) foi adicionado a 40 µl da mistura contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10 pmol de cada ‘primers’ senso, 20 pmol do “primer” antisenso e 1,5 U/µl de *Taq* DNA polimerase. A PCR foi realizada a 94°C por 4 min.; 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 65°C por 30 seg. e 72°C por 30 seg.; e 72°C por 4 min.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2% corado com solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta

3.1.6 Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose.

Cerca de 25% (10 µl) do volume da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose (2%) com 0,5 µg de brometo de etídio/ml para a verificação do resultado da PCR. Os fragmentos de DNA separados em gel foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. O tampão utilizado para a corrida eletroforética foi TEB 1X (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.1.7 Alinhamento das seqüências.

As seqüências publicadas dos genes dos organismos foram obtidas a partir do banco de seqüências GenBank. O programa utilizado para comparar as seqüências de nucleotídeos foi o FASTA desenvolvido por PEARSON & LIPMAN (1988).

4 ARTIGO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Propiciar um diagnóstico para a tuberculose que seja preciso, rápido e com baixo custo é o objeto de estudo de muitos pesquisadores. Para *M. tuberculosis*, várias técnicas tem sido propostas, entretanto, ainda não se obteve um denominador comum para a região a ser amplificada através da técnica de PCR.

O predominante desafio que nós propusemos neste trabalho foi de buscar uma nova região do gene da micobactéria para ser amplificada, que estivesse presente em todos os indivíduos e que fosse específica da espécie em estudo.

A principal dificuldade está em determinar uma região que seja específica para *M. tuberculosis*. A grande maioria dos trabalhos aponta a região IS6110 como o

alvo principal para ser amplificado. Entretanto, a escolha desta região implica na polêmica discussão quanto à especificidade da região. Alguns trabalhos apontam a região como sendo de alta especificidade e outros artigos evidenciam ampliações de DNA inespecíficas ou até mesmo demonstram a falta em algumas *M. tuberculosis* da região a ser amplificada (van SOOLINGEN, 1993; FUMOKONG *et al.*, 1994; KENT *et al.*, 1995; HELLYER *et al.*, 1996; McHUGH *et al.*, 1997; GITHUI *et al.*, 1999; DZIADEK *et al.*, 2001). Outras regiões também são objeto de estudo: a região 16S do rRNA ou *hsp65*, entretanto, estas ainda necessitam de trabalhos posteriores, como técnicas de sequenciamento para a confirmação do diagnóstico. Já a técnica do uso de RFLP, apresentada em muitos estudos, apesar de específica e sensível, se torna inviável para ser adotada como rotina nos laboratórios em virtude de ser extremamente árdua (DOBNER *et al.*, 1996; DESJARDIM *et al.*, 1996; DEVALLOIS *et al.*, 1997; KAMERBEEK *et al.*, 1997; SANSILA *et al.*, 1998; NINET *et al.*, 1999).

Utilizando a região dos genes *fabG* e *inhA* e do gene da fosfolipase C (*plc B* e *C*), construímos “primers” com a intenção de diferenciar o Complexo *M. tuberculosis* do complexo *M. avium*, mas também identificar a espécie *M. tuberculosis* dentro do complexo *M. tuberculosis*, em uma única reação.

Neste primeiro momento, como foi demonstrado no artigo, optamos por testar os “primers” BC3 e BC5, construídos a partir do gene da fosfolipase C (*plc A*, *B* e *C*) em amostras de escarro dos pacientes com suspeita de tuberculose.

De acordo com o trabalho de BEHR *et al.*, (1999) a deleção de 3 genes da fosfolipase C (*plc A*, *B* e *C*) em *M. bovis* (cepa virulenta e cepa BCG) em correlação a *M. tuberculosis* (H37Rv) mostrou uma importante diferença entre os genomas, diferença essa que possibilitou construir “primers” que permitissem amplificar a região e com isso promover a diferença entre essas duas bactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*.

Em outro estudo, baseado nos trabalhos de COLE *et al.*, (1998), de acordo com a análise do genoma das micobactérias, foram descritas proteínas que

possivelmente estejam envolvidas na biossíntese dos ácidos micólicos, que é o principal constituinte da parede da membrana de todas as micobactérias. Nas micobactérias, a enzima 2 enoil ACP (CoA) redutase, produto do gene *inhA* parece ser a única enoil redutase presente e seu gene é co-transcrito com o gene *fabG*, que codifica uma 3-oxoacil-ACP redutase.

Conforme os mapas de COLE *et al.*, (1998) para *M. tuberculosis* e LABO *et al.*, (1998), para *M. avium*, existe uma região intergênica existente entre os genes *fabG/G1* e *inhA* de aproximadamente 19 e 34 pb, respectivamente (Figura 2).

Um estudo mais minucioso desta região, mostra que existe uma grande similaridade entre a região C-terminal dos genes *fabG1/G* (102 pb terminais) das duas micobactérias, ao contrário das regiões N-terminal dos genes *fabG* (665 pb) de *M. avium* e *fabG1* (641 pb) de *M. tuberculosis* que apresentam diferenças significativas. Por outro lado, o gene *inhA* de ambas micobactérias é extremamente conservado.

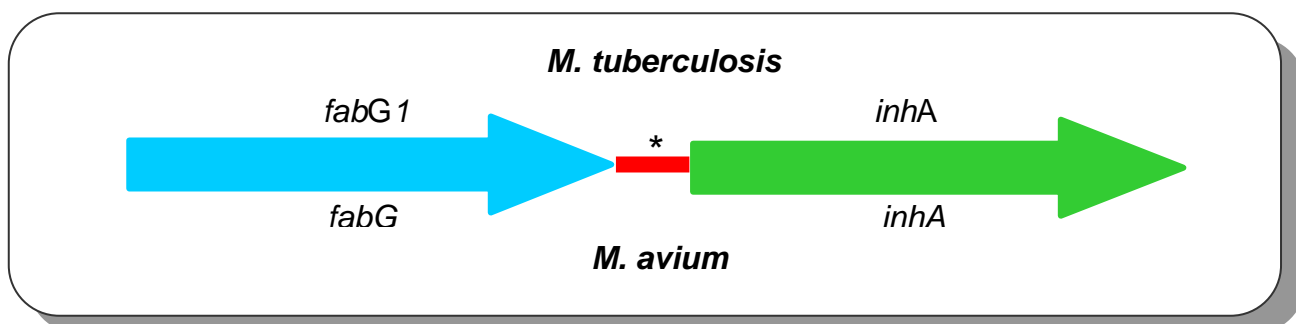


Figura 2: Desenho esquemático da região intergênica de *M. tuberculosis* e *M. avium*. Em *M. tuberculosis* a região intergênica apresenta cerca de 19 pb e em *M. avium* 34 pb.

Baseando-se na característica destes dois genes, desenhamos três “primers” para diferenciarmos o *M. tuberculosis* de *M. avium* em uma PCR multiplex. Devido ao alto nível de similaridade dos genes *inhA* das duas micobactérias, um “primer” antisense foi desenhado correspondendo à região N-terminal do gene de *M. tuberculosis*. Para amplificar especificamente parte do DNA de *M. tuberculosis*, um “primer” sense foi desenhado a partir da região C-terminal do gene *fabG1* de *M.*

tuberculosis. Por outro lado, um segundo “primer” senso foi desenhado a partir da região intergênica dos genes *fabG* e *inhA* de *M. avium* para amplificar especificamente parte do DNA de *M. avium* (Figura 03). A construção destes “primers” foi feita com o cuidado para que seus respectivos amplicons sejam de tamanhos diferentes (194 e 258 pb para *M. avium* e *M. tuberculosis*, respectivamente), a fim de facilitar a diferenciação entre as espécies, em gel de agarose.

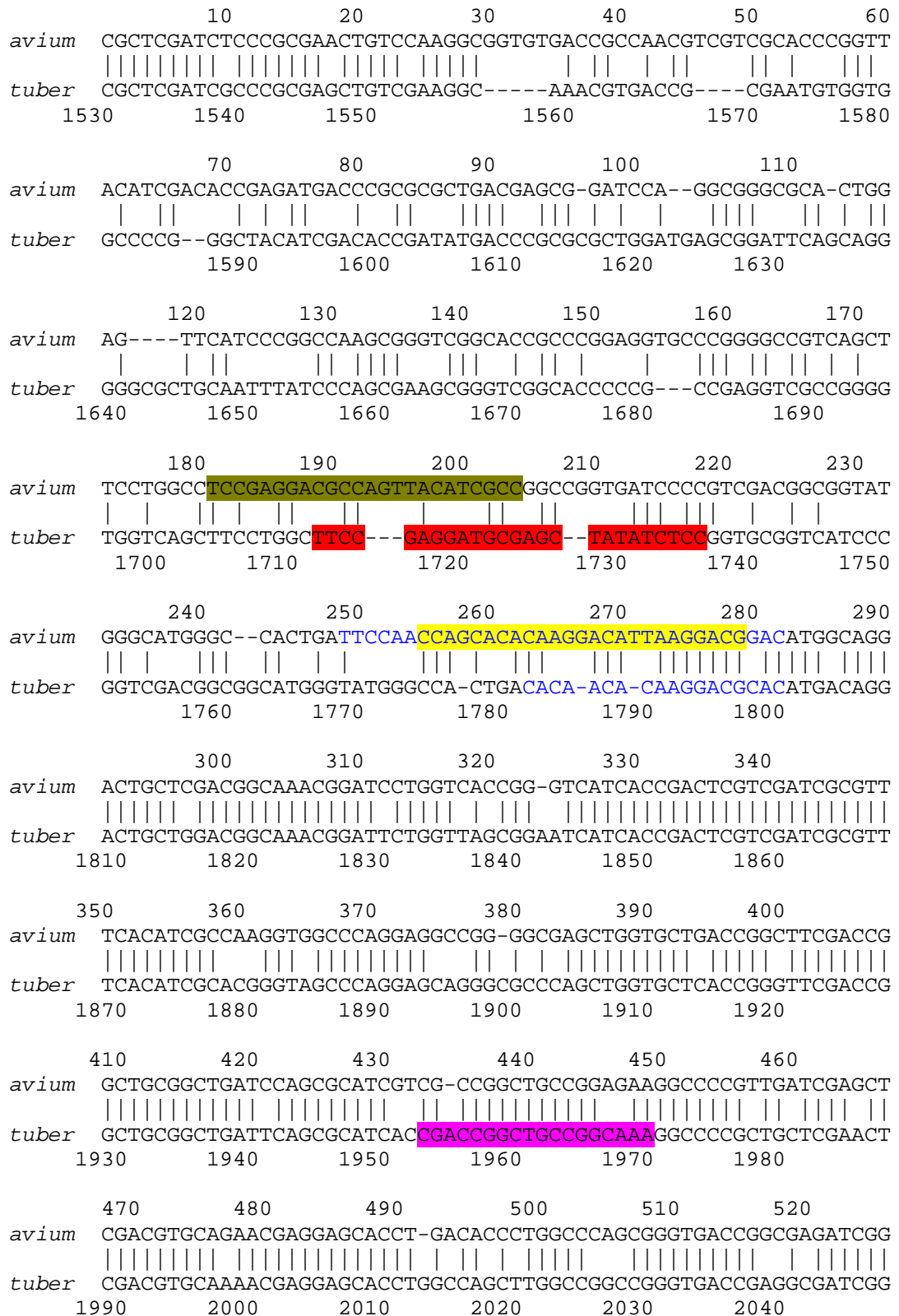


Figura 3: Alinhamento de parte das seqüências dos genes *fabG/G1* e *inhA* de *M. avium* (AF002133) e *M. tuberculosis* (NC000962). Os nucleotídeos sombreados correspondem ao “primer” INTERAVI, em amarelo, INTER3, em rosa, INTER5 em vermelho, e a região provável de anelamento do “primer” INTER5, em verde.

Os nucleotídeos em azul correspondem à região intergênica das seqüências de ambas bactérias. Abreviaturas: avium (*M. avium*) e tuber (*M. tuberculosis*).

Em *M. tuberculosis* um amplicon esperado de aproximadamente 258 pb foi amplificado (Figura 4). Porém, amplicons de tamanho aproximado também foram amplificados em *M. aurum*, *M. bovis*, *M. chubuense*, *M. gordonae uredoticum*, *M. scrofulaceum* e *M. triviale*. Em *M. bovis*, a amplificação de um produto de 258 pb não foi surpresa, porque *M. tuberculosis* e *M. bovis* pertencem ao complexo *M. tuberculosis* além de possuírem uma grande similaridade nucleotídica. Em *M. avium*, foi amplificado um amplicon de aproximadamente 270 pb e um amplicon esperado de 194 pb. O amplicon de 270 pb também foi observado em *M. intracellulare* e *M. marinum*. Como *M. avium* e *M. intracellulare* formam o complexo *M. avium*, provavelmente, este amplicon não foi o resultado de uma amplificação aleatória. A região provável que o “primer” INTER5 esteja anelando ao DNA de *M. avium* está sombreada de verde na Figura 3.

Experimentos foram realizados com novas condições de amplificação, porém não foi possível amplificar somente os DNAs dos Complexos *M. avium* e *M. tuberculosis* (dados não mostrados).

Novos experimentos deverão ser realizados e provavelmente o desenho de novos “primers” para a otimização da técnica da PCR Multiplex.

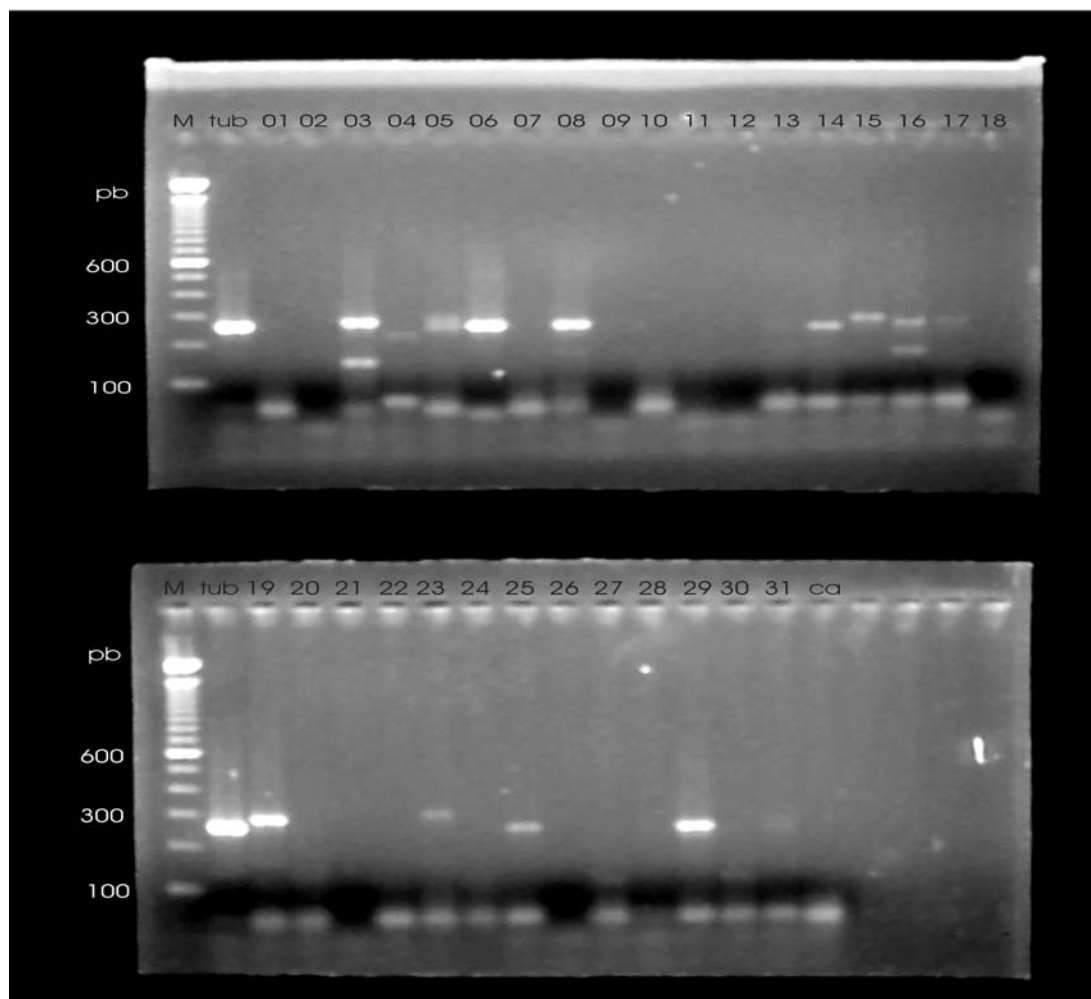


Figura 4: Amplificação de DNA das culturas de mycobactérias com os “primers” INTER5, INTERAVI e INTER3. M-marcador de peso molecular 100 pb (Gibco); tub-*M. tuberculosis* ; 1-*M. abscessus*; 2-*M. aichiense*; 3- *M. avium*; 4-*M. asiaticum*; 5- *M. aurum*; 6-*M. bovis*; 7-*M. chitae*; 8-*M. chubuense*; 9-*M. duvale*; 10-*M. flavescens* 11-*M. fortuitum*; 12-*M. gastri*; 13-*M. gordonae*; 14-*M. gordonae uredoticum*; 15-*M. intracellulare*; 16-*M. kansasii*; 17-*M. leutiflavum*; 18-*M. mageritense*; 19-*M. marinum*; 20-*M. neoaurum*; 21-*M. nonchromogenicum*; 22-*M. parafortuitum*; 23-*M. peregrinum*; 24-*M. porcinum*; 25-*M. scrofulaceum*; 26-*M. simiae*; 27-*M. smegmatis*; 28-*M. szulgae*; 29-*M. triviale*; 30-*M. vaccae*; 31-*M. xenopi*; ca-controle da amplificação

6 PERSPECTIVAS

Neste momento, a abordagem visou a amplificação de uma região específica dos genes da Fosfolipase *C* e *B*; em estudos futuros, tentaremos desenvolver um sistema PCR multiplex, o qual em apenas uma reação de amplificação poderá diferenciar o Complexo *M. avium* do Complexo *M. tuberculosis* e *M. tuberculosis* das demais micobactérias.

7 ABSTRACT

Among the diseases caused by bacteria of the gender *Mycobacterium*, the tuberculosis for *M.tuberculosis* is the more known. The diagnosis of the disease is made by using a group of exams that make the identification of the same possible (WATT, 2000). However, it is known that the combined diagnosis of direct microscopia with the subsequent isolation in middle of cultivation, is constituted of the "stand-gold". The main disadvantage of this method is that this bacterium possesses a slow growth (about 8 weeks). Recently, the detection of diseases through the technique of chain reaction of the polimerase (PCR) has been providing significant progresses to the diagnosis. The use of the specific amplification of genes, to identify the *M. tuberculosis*, such as rRNA 16S, IS6110 or the intergenic region *senX3-regX3*, has been presenting some restrictions, to the reliability and sensibility level, for the application of the PCR technique. The present study shows the construction and the application of a new goal for the amplification of PCR in the diagnosis of the tuberculosis, based on the rehearsal of the difference of genics organization of the operon *plcA*, *B* and *C* differentiating the *M. tuberculosis* of the other micobacterias. In this work, 273 samples of patients with tuberculosis suspicion were examined, being these submitted to the comparative study of the technique of PCR versus cultivation (stand-gold). PCR amplified fragments of 439pb. The results show 93,7% of accuracy for PCR/Cultivo ($p<000,1$), 93,1% of sensibility with interval of trust of 88,7-96,0 and specificity of 96,4% with interval of trust of 96,4-99,4. statistics Kappa value (k) was of 0,82 with standard mistake of 0,041, demonstrating an alignment closet perfect for the verification of the agreement degree among the tests. This way, the use of this new area for the amplification of PCR is shown as an important and reliable tool for the specific diagnosis of the tuberculosis.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, C.; HIRANO, K.; WADA, M.; KAZUMI, Y.; TAKAHASHI, M.; FUKASAWA, Y.; 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.

BARBAGALLO, J.; TAGER, P. INGLETON, R.; HIRSCH, R. J.; WEINBERG, J. M. *Cutaneous tuberculosis: diagnosis and treatment.* *Am. J. Clin. Dermatol.*, 3(5):319-328, 2002.

BARNES, D. Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. *Microbes and Infection*, 2:431-440, 2000.

BEGGS, M. L.; STEVANOVA, R.; EISENACH, K. D. Species Identification of *Mycobacterium avium* Complex Isolation by a Variety of Molecular Techniques. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 508-512, 2000.

BEHR, M. A.; WILSON, M. A.; GILL, W. P.; SALAMON, H.; SCHOOLNIK, G. K.; RANE, S. & SMALL, P. M. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, 284:1520-1523, 1999.

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.

BERGMANN, J. S.; YUOH, G.; FISH, G. & WOODS, G. Clinical evaluation of the enhanced Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates. *J. Clin. Microbiol.*, 37:1419-1425, 1999.

BLACKWOOD, K. S., S. HE, J. GUNTON, C. Y. TURENNE, J. WOLFE, & A. M. KABANI. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 38:2846-2852, 2000.

BLOOM, B. R. Tuberculosis: patogenesis, protection, and control. ASM Press, Washington, DC., 1994.

BLOOM, B. R. & MURRAY, C. J. L. tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. *Science*, 257:1055-64, 1992.

BODMER, T.; GURTNER, A.; SCHOLKMANN, M. & MATTER, L. Evaluation of the COBAS AMPLICOR MTB system. *J. Clin. Microbiol.*, 35:1604-1605, 1997.

BODMER, T.; MILTNER, E.; BERMUDEZ, L. E.; *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1;182 (1):45-49, 2000.

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*. 2. ed. rev. Rio de Janeiro: CNCT/NUTES, 102p, 1989.

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*. 3ed. Rev. Rio de Janeiro, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia Sanitária. *Boletim de Pneumologia Sanitária*. Rio de Janeiro, 6(1), 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano Nacional de Controle da Tuberculose. *Manual de Normas*. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N.; JAWETZ, E.; MELNICK, J. L. & ADELBREG, E. A. *Med. Microbiol.*, 20. ed. 1995.

BROCK, T. D. Robert Koch: a life in medicine and bacteriology. Washington DC: ASM press, 1999.

BRUDNEY, K. & DOBKIN, J. Ressurgent tuberculosis in New York City: human immunodeficiency virus, homelessness, and the decline of tuberculosis control programs. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 144:745-749, 1992.

BURGER M.; RASKIN, S.; BROCKELT, S.; AMTHOR, B.; GEISS, H. K. & HAAS, W. H. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex culture isolates collected in Brazil and spotted on filter paper. *J. Clin. Microbiol.*, 36:573-576, 1998.

CARMO, A. M. S.; SILVA, R. R. F. & HAMATSU, L. S. Avaliação da positividade em culturas para micobactérias, realizadas pelo método de Ogawa-Kudoh, frente às baciloscopias negativas. *LAES & HAES* 137 (23): 126-132, 2002.

CECCON, E.; AERTS, D.; WIEDERKEHR, P. Perfil Epidemiológico dos casos notificados de TB segundo fonte notificadora. *I Workshop da Rede Brasileira de pesquisa em Tuberculose(REDE TB)*, Rio de Janeiro, 2002.

CLOUD, J. L. ; NEAL, H.; ROSENBERRY, R.; TURENNE, C. Y.; JAMA, M.; HILLYARD, D. R. & CARROLL, K. C. Identification of *Mycobacterium* spp. By using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J. Clin. Microbiol.*, 40:400-406, 2002.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393:537-544, 1998.

DESJARDIM, L. E.; PERKINS, M. D.; TEIXEIRA, L.; CAVE, M. D. & EISENACH, K. D. Alkaline decontamination of sputum specimens adversely affects stability of mycobacterial mRNA. *J. Clin. Microbiol.*, 34(10):2435-2439, 1996.

DEVALLOIS, A.;PICARDEAU, M.; GOH, K. S.; SOLA, C.; VINCENT, V.; & RASTOGI, N. Comparative Evolution of PCR Commercial DNA Probes for Detection and Identification to Species Level of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 34:2756-2759, 1996

DEVALLOIS, A.; GOH, K. S.; & RASTOGI, N. Rapid identification of Mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of na algorithm to differentiate 34 Mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.*, 35:2969-2973, 1997.

DEZ PREZ, R. M. & HEIM, C. R. *Mycobacterium tuberculosis*. In: MANDELL, G. L.; DOUGLAS JR.; BENNETT, J. E. (Ed.). *Principles and practice of infectious diseases*. 3.ed. New York: Churchill Livingstone, p. 1877-1906, 1990.

DOBNER, P.; FELDMANN, K.; RIFAI, M.; LOSCHER, T. & RINDER, H. Rapid identification of Mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter region. *J. Clin. Microbiol.*, 34:866-869, 1996.

DZIADEK, J.; SAJDUDA, A. & BORUN T. M. Specificity of insertion sequence-based PCR assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 5:569-574, 2001.

EL AMIN, N. M., H.-S. HANSON, B. PETTERSSON, B. PETRINI, AND L. V. VON STEDINGK Identification of non-tuberculous mycobacteria: 16S rRNA gene sequence analysis vs. conventional methods. *Scan. J. Infect. Dis.* 32:47-50, 2000.

ESPINAL, M. A.; KIM, S. J.; SUAREZ, P. G. et al. Standard short-course chemotherapy for drug resistant tuberculosis: treatment outcome in 6 countries. *JAMA*, 283:2537-2545, 2000.

FIUZA DE MELO, F. A.; AFIUNE, J. B.; ALMEIDA, E. A.; SPADA, D. T. A. & CASTELO FILHO, A. Aumento da resistência primária do *Mycobacterium tuberculosis* as drogas antituberculosas, na década de noventa, em uma unidade de referência na cidade de São paulo, Brasil. *I Workshop da Rede Brasileira de pesquisa em Tuberculose(REDE TB)*, Rio de Janeiro, 2002.

FUMOKONG, N. G.; DALE, J. W.; OSBORN, T. W. & GRANGE, J. M. Insertion sequence typing of *M. tuberculosis*: characterization of a widespread sub-type with single copy of IS6110. *Tubercle Lung Dis.*, 75:435-440, 1994.

GITHUI, W. A.; WILSON, S. M. & DROBNIEWSKI, F. A. Specificity of IS6110-based DNA fingerprinting and diagnostic techniques for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 37:1224-1226, 1999.

GORDIN, F. & SLUTKIN, G. The validity of acid-fast smears in the diagnosis of tuberculosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 114:1025-1027, 1990.

GOTO, M.; OKA, S.; OKUZUMI, K.; KIMURA, S. & SHIMADA, K. Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. *J. Clin. Microbiol.*, 29:2473-2476, 1991.

GRINSZTEJN, B.; FANDINHO, F. C.; VELOSO, V. G.; JOÃO, E. C.; LORENÇO, M. C.; NOGUEIRA, S. A.; FONSECA, L. S.; WERNECK-BARROSO, E. *Mycobacterium* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Intern. Méd.*, 157: 2359-2363, 1997.

HAVLIR, D. V. & ELLNER, J. J. *Mycobacterium avium* complex. In: Infectious Diseases and Their Etiologic Agents. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fourth edition, 2:2250-2258, 1995.

HAWKINS, J. E. Rapid mycobacterial susceptibility tests. *Clin. Microbiol. Newslett.*, 8:101-104, 1986.

HEELYER, 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.*, 34:2843-2846, 1996.

HEUBNER, R. E.; GOOD, R. C. & TOKARS, J. I. Current practices in mycobacteriology: results of a survey of state public health laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, 31:771-775, 1993.

HORSHBURGH, R. C. *Mycobacterium avium* Complex Infection in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N. Eng. J. Med.*, 324: 1332-1338, 1991.

HORSHBURGH, R. C. The Pathophysiology of Disseminated *Mycobacterium avium* Complex Disease in AIDS. *J. Infect Dis.*, 179: 461-465, 1999.

JOKLIK, *et al.* Zinsser Microbiology, 20. Ed. Stanford: Appleton and Lange, Cap. 31, p. 497-525, 1992.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; van AGTERVELD, M.; van SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M. & van EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, 35:907-914, 1997.

KENT, L.; McHUGH, T.D.; BILLINGTON, O.; DALE, J. W. & GILLESPIE S. H. Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Micobacterium spp.* *J. Clin. Microbiol.*, 33:2290-2293, 1995.

KIRSCHNER, P., SPRINGER B., VOGEL U., MEIER A., WREDE A., KIEKENBECK M., BANGE F. C. & BÖTTGER E. C. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 31:2882-2889,1993.

KLIEMANN, J. Atividades previnem a tuberculose. *Correio do Povo*, Porto Alegre, 26 mar. 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERG, P. C.; WINN JR., W. C. *Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992.

KONEMAN, E. W. et al. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B.; JAMAL, L. Tuberculose e infecção pelo HIV: aspectos atuais sobre diagnóstico, tratamento e prevenção. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, 6(2):53-61, 1998.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B.; SOUSA, G. R. M. Tuberculose do Ambulatório à Enfermaria, 2^a ed. 2000.

LABO, M.; GUSBERTI, L.; ROSSI, E. D.; SPEZIALE, P. & RICCARDI, G. Determination of a 15437 bp nucleotide sequence around the *inhA* gene of *Mycobacterium avium* and similarity analysis of the products of putative ORFs. *Microbiology*, 144:807-814. 1998.

LAPPAYAWICHIT, P., RIENTHONG S., RIENTHONG D., CHUCHOTTAWORN C., CHAIPRASERT A., PANBANGRED W., SARINGCARINKUL H. & PALITTAPONGARNPIM P. Differentiation of *Mycobacterium* species by restriction enzyme analysis of amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer sequences. *Tubercle Lung Dis*. 77:257-263. 1996.

LEVINSON, W. & JAWETZ, E. *Medical Microbiology and Immunology*. 6th ed. USA: The McGraw-Hill Company, 2000.

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.

LIM, A.; ELEUTERIO, M.; HUTTER, B.; MURUGASU-OEI, B. & DICK, T. Oxygen depletion-induced dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Bacteriology*, 181(7):2252-2256, 1999.

McHUGH, T. D.; NEWPORT, L. E. & GILLESPIE, S. H. IS6110 homologs are present in multiple copies in Mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 35:1769-1771, 1997.

McKINNEY, J. Persisting problems in tuberculosis. In: Krause, R. *Emerging Infections – Biomedical Research Reports*. New York: Academic Press, Cap. 3, p. 5-146, 1998.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. 1995.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. & PFALLER, M. A. *Mycobacterium avium-intracellulare*. *Microbiologia Médica*, 3. ed., p. 170-275, 1998.

NINET, B.; RUTSCHMANN, O.; BURKHARDT, K.; METRAL, C.; BORISCH, B. & HIRSCHL, B. Detection of mycobacterial nucleic acids by polymerase chain reaction in fixed tissue specimens of patients with human immunodeficiency virus infection. Swiss HIV Cohort Study. *Diagn. Mol. Pathol.*, 8(3):145-151, 1999.

O'reilly, L. M. & DABORN, J. C. *Tuberc Lung. Dis.* 76 (suppl.1), 1 :1995.

PATEL, J. B., D. G. B. LEONARD, X. PAN, J. M. MUSSER, R. E. BERMAN, & I. NACHAMKIN. Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *J. Clin. Microbiol.* 38:246-251, 2000.

PEARSON, W.R. & LIPMAN, D.J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448, 1988.

PECHÈRE, J. C. (ED.) *Intracellular Bacterial Infections*. Cambridge:British Library, 1 ed., 1996.

RINGUET, H., C. AKOUA-KOFFI, S. HONORE, A. VARNEROT, V. VINCENT, P. BERCHE, J. L. GAILLARD, & C. PIERRE-AUDIGIER. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 37:852-857, 1999.

RIO GRANDE DO SUL (A). Secretaria da Saúde. Número de casos das doenças de notificação compulsória por CRS, RS, 1999-2000. *Boletim Epidemiológico*, 1(1), ago.2001.

RIO GRANDE DO SUL (B). Secretaria Estadual da Saúde. Coordenação de Atenção Integral à Saúde. *Tuberculose. Coordenação de Pneumologia Sanitária*. Normas Técnicas e Operacionais. Porto Alegre, 2001.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Número de casos das doenças de notificação compulsória por CRS, RS, 2000-2001. *Boletim Epidemiológico*, 2(1), mar.2002.

ROTH A., REISCHL U., STREUBEL A., NAUMANN L., KROPPESTEDT R. M., HABICHT M., FISCHER M. & MAUCH H. Novel Diagnostic Algorithm for Identification of Mycobacteria Using Genus-Specific Amplification of the 16S-23S rRNA Gene Spacer and Restriction Endonucleases. *J. Clin. Microbiol.* 2000 38: 1094-1104, 2000.

SAMBROOK, F.; FRITISCH, E. F. & MANIATIS, T. *Manual cloning: a laboratory manual*, CSHL, 1989.

SANSILA, A.; HONGMANEE, P.; CHUCHOTTAWORN, C.; RIENTHONG, S. & PALITTAPONGARNPIM, P. Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* by amplification of the 16S-23S ribosomal DNA spacer. *J. Clin. Microbiol.*, 36:2399-2403, 1998.

SAVES, I.; LEWIS, L.A.; WESTRELIN, F.; WARREN, R.; DAFFÉ, M. & MASSON J. M. Specificities and functions of the *recA* and *pps1* intergenic genes of *M. tuberculosis* and application for diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 40(3): 943-950, 2002.

SHINNICK, T. M., & R. C. GOOD. Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13:884-901, 1994.

SMEULDERS, M. J.; KEER, J.; SPEIGHT, R. A. & WILLIAMS, H. D. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *J. Bacteriol.*, 181(1):270-283, 1999.

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.

SUAREZ, P. G.; FLOYD, K.L; PORTOCARRERO, J.; ALARCON, E.; RAPITI, E.; RAMOS, G.; BONILLA, C.; SABOGAL, I.; ARANDA, I.; DYE, C.; RAVIGLIONE, M. & ESPINAL, M. A. Feasibility and cost-effectiveness of standardised second-line drug treatment for chronic tuberculosis patients: a national cohort study in Peru. *Lancet*, 359(9322):1980-1989, 2002.

TAYLOR, T. B., PATTERSON C., HLAE Y. & SAFRANEK W. W. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J. Clin. Microbiol.* 35:79-85, 1997.

TELENTI, A., F. MARCHESI, M. BALZ, F. BALLY, E. C. BOETTGER, & T. BODMER. Rapid identification of mycobacteria to species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:175-178 1993.

TORKKO, P., SUUTARI M., SUOMALAINEN S., PAULIN L., LARSSON L. & KATILA M. L. Separation among species of *Mycobacterium terrae* complex by lipid analysis: comparison with biochemical tests and 16S rRNA sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 36:499-505, 1998.

van SOOLINGEN, D.; HASS, P. W.; HERMANS, P. W.; 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.

VERONESI, R. Tuberculose. In: VERONESI, R. & FOCACCIA, R. (ed.). *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, 1996.

WAYNE, L. G. The "atypical" mycobacteria: recognition and disease association. *Crit. Rev. Microbiol.* 12:185-222, 1985.

WAYNE, L. G. & KUBICA, G. P. Genus *Mycobacterium*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, vol. 2, p. 1436-1457, 1986.

WAYNE, L. G. & HAYES, L. G. Na in vitro model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun*, 64(6):2062-2069, 1996.

WAYNE, L. G. & LIN, K. Y. Glyoxylate metabolism and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infect Immun*, 37(3):1042-1049, 1982.

WATT. B. Issue facing TB control (5.1). (a). Diagnostic issues: laboratory diagnosis of tuberculosis present techniques. *Scott. Med J.* 45: 38-39, 43, 2000.

WILSON, R. W., STEINGRUBE, V. A., BROWN, B. A., & WALLACE, R. J. Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic actinomycete isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:148-152, 1998.

WITEBSKY, F. G., A & P. S. CONVILLE. The laboratory diagnosis of mycobacterial diseases. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 7:359-377, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2002. WHO/CDS/TB/2002.295.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control. *WHO Report 2001*. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2001.287.

YAJKO, D. M.; WAGNER, C.; TEVERE, V. J. et al. Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the Amplicor PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 33:1944-1947, 1995.