ARTIGO ORIGINAL / *ORIGINAL ARTICLE*

Análise mutacional por DHPLC de estirpes multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*

/ **E. Oramas**
/ **R. Macedo**
/ **L. Brum**

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa
Centro de Bacteriologia e Micologia Professor Doutor Arnaldo Sampaio, Unidade de Micobactérias

Correspondência:
Rita Macedo
Unidade de Micobactérias
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Av. Padre Cruz
1649-016 Lisboa
Telefone: +351 217519235
Fax: +351 21 7526400
e-mail: ana.macedo@insa.min-saude.pt

/ Resumo

Introdução: A tuberculose é actualmente a maior causa de morte por agentes infecciosos a nível mundial com cerca de 1,5-2 milhões de mortes por ano[1] e estudos de vigilância demonstraram que 1/3 da população mundial está infectado[1]. O aparecimento de resistências aos antibióticos, e em particular a multirresistência, tem constituído um verdadeiro desafio aos esforços dos programas de controlo da tuberculose[2].

Objectivos: O principal objectivo deste estudo é contribuir para a implementação de uma tecnologia rápida de detecção de estirpes multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* através da análise dos genes que conferem resistência à isoniazida e à rifampicina. Para o efeito, pretende utilizar-se a técnica de DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography).

Métodos: Foram analisadas 83 amostras de micobactérias resistentes à isoniazida e/ou à rifampicina por sequenciação automática e DHPLC. Os genes estudados foram o *katG* e o *inhA* (conferem resistência à isoniazida) e o *rpoB* (confere resistência à rifampicina).

Resultados: Foi possível identificar a presença de mutações em todas as amostras e genes em estudo.

Conclusão: Podemos concluir que esta tecnologia traz vantagens ao diagnóstico de tuberculose que, ao detectar de forma rápida as referidas resistências, evita o mau uso de fármacos que potenciam o aparecimento de multirresistências.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Multirresistência; D-HPLC

/ *Abstract*

Introduction: *Tuberculosis is nowadays the largest death cause by infectious agents, with a 1,5-2 millions deaths per year worldwide. Surveillance studies further demonstrated that one third of the world population is infected. The emerging of drug-resistant and multidrug-resistant strains constitutes a true challenge to the effort of tuberculosis control programs.*

Aim: *The main objective of this work is to contribute for the implementation of a fast technology, detecting Mycobacterium tuberculosis multiresistant strains through the analysis of the genes that confer resistance to isoniazid and to rifampin. A relatively new technique was used: DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography).*

Methods: *Automatic sequencing and DHPLC were used to analyse 83 strains, resistant to isoniazid and to rifampin. The genes studied were the katG and inhA*

genes (which confer resistance to isoniazid) and the rpoB gene (which confer resistance to rifampin).
Results: *The analysis of those genes by DHPLC allowed the identification of mutation in all cases.*
Conclusion: *The DHPLC technique was found to be very useful for tuberculosis resistance diagnosis and, by rapidly detecting mutations associated with the resistance, could prevent the bad use of drugs and consequently the emergency of multidrug resistance.*

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis; Multidrug resistance; D-HPLC*

/ Introdução

A tuberculose é uma doença infecciosa que tem acompanhado o desenvolvimento social das diversas populações. Os primeiros casos surgiram em meados dos anos 90 e, em 2005, a OMS declarou que 1,1% dos novos casos de tuberculose em todo o Mundo eram multirresistentes.[2] Actualmente um terço da população mundial está infectado[1], com particular incidência nos países mais pobres do Continente Africano, América do Sul e Ásia.[3,4,5] Para este agravamento contribuíram vários factores, tais como: aumento da pobreza, situações de exclusão social, toxicodependência, movimentos migratórios a partir de regiões com índices de tuberculose muito elevados, desactivação parcial de medidas de luta anti-tuberculose[1,6] e a pandemia da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana[7,8]. A era moderna da tuberculose surge associada a um problema que contribui para a dificuldade no seu controlo e para o aumento do número de infecções por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) resistentes aos antibacilares de primeira linha – isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol, pirazinamida.[7,9] As estratégias de resistência envolvem: mecanismos de barreira (diminuição da permeabilidade a antibióticos), enzimas de degradação ou inactivação, modificação das vias envolvidas na activação ou metabolismo dos antibióticos e amplificação dos alvos (resistência natural).[10,11,12] No entanto, o principal mecanismo é a ocorrência de alterações genéticas em genes associados à resistência aos diferentes antibacilares.[13]

A isoniazida inibe a síntese do ácido micólico na parede celular por vias dependentes de oxigénio, no entanto, este mecanismo não funciona se ocorrerem mutações nos genes *katG*, *inhA*, *kasA* ou *ahpC*. [10,12] A modificação do gene *katG* leva à destruição ou diminuição da actividade da catalase-peroxidase, com consequente aumento da síntese de ácidos micólicos.[10,12] O *inhA* codifica a enzima InhA (enoil ACP redutase NADH-dependente), que está envolvida na síntese do ácido micólico na parede. A inibição ocorre devido ao aparecimento de uma mutação no local activo da enzima, que diminui a sua afinidade para o NADH e, consequentemente, os radicais de isoniazida activos.[12]

A rifampicina é um antibiótico que bloqueia a síntese de RNA micobacteriano por se ligar especificamente e inibir a RNA polimerase. A resistência à rifampicina resulta de mutações no gene *rpoB* que alteram a subunidade ß da RNA polimerase.[12,13,14]

Assim, a identificação das mutações nos genes pode fornecer meios para um rápido screening de isolados de *M. tuberculosis* resistentes a antibióticos.[14,15] O método de escolha para a análise de mutações tem sido a sequenciação automática de DNA do gene em causa. Contudo, é uma abordagem dispendiosa e muito morosa.

A técnica de DHPLC é uma metodologia recente, que permite a análise mutacional através da formação de heteroduplexes entre cadeias de DNA mutadas e não mutadas. As moléculas em heteroduplexes são, então, separadas dos homoduplexes usando a técnica de cromatografia líquida de fase reversa, que usa uma coluna especial que permite a desnaturação parcial, por aquecimento, das cadeias de DNA (Figura 1). Este foi o método utilizado neste estudo por permitir, a partir de picos cromatográficos, fazer a detecção de mutações nos genes identificando, desta forma, as estirpes resistentes.[14,15] Além da sua elevada sensibilidade, é uma técnica que permite a injecção automática das amostras e não requer nenhum tratamento especial do produto de PCR.[16]

/ Material e Métodos

População em estudo:
Foram analisadas 83 estirpes de *M. tuberculosis* resistentes a antibióticos, das quais 11 apresentaram mutação no gene *katG*, 30 no gene *inhA* e 42 no gene *rpoB*. Estas mutações foram previamente confirmadas por sequenciação automática usando o sequenciador ABI Prism 3130 XL (PE Applied Biosystems, Foster City, California). Como controlo foram utilizadas estirpes H37Rv de referência do tipo selvagem.

Não houve comprometimento dos dados clínicos dos doentes e foi garantido o anonimato de todos os casos estudados.

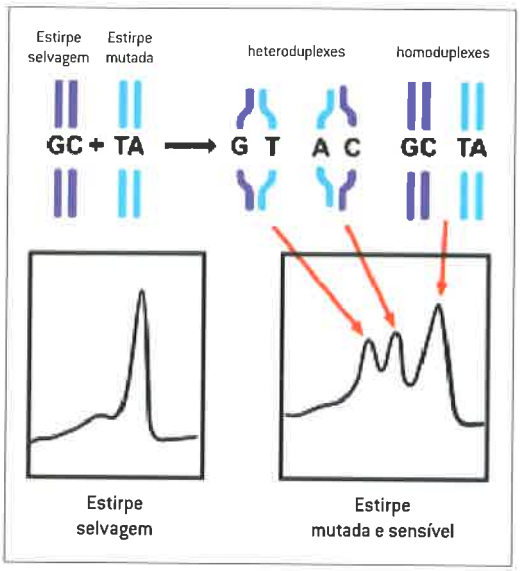


Figura 1 – Cromatograma representativo da análise de homoduplexes e heteroduplexes por DHPLC.
Adaptado de http://www.zenonbio.hu/transgenomic/dhplc_process.gif

TABELA I – PRIMERS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Gene	Sequência dos oligonucleotídeos (5'→3')
katG	AGC TCG TAT GGC ACC GG AC TTG ACC TCC ACC CGA CTT G
inhA	CCT CGC TGC CCA GAA AGG GA ATC CCC CGG TTT CCT CCG GT
rpoB	GGA GGG GAT GAC CAC CCA GCG GTA CGG CGT TTC GAT GAA

TABELA II – TEMPERATURAS DA COLUNA E PERCENTAGENS DE TAMPÃO B USADAS PARA DETECTAR AS MUTAÇÕES NOS GENES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Gene	Pares de bases	Tampão B (%)	Temperatura (C°)
katG	620	59	65
inhA	239	51	64
rpoB	408	54	67

Teste de sensibilidade a antibióticos e extracção do DNA:
Os isolados clínicos foram previamente identificados e caracterizados quanto aos fenótipos de susceptibilidade aos antibacilares de 1ª linha pelo laboratório de micobactérias do INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge). A extracção de DNA foi efectuada através do método descrito por van Soolingen (1991).

Caracterização das resistências
A amplificação foi feita num termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems, California) usando 1U de TaqDNA polymerase (Applied Biosystems, New Jersey) e as seguintes condições de amplificação: 15 minutos de desnaturação a 95°C; 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anneling (65°C para o gene *inhA;* 58°C para o gene *katG*; e 59°C para o *rpoB*) e 30 segundos de extensão a 72°C; a reacção terminou com uma extensão durante 10 minutos a 72°C. Os primers utilizados para a amplificação dos genes de resistência encontram-se na tabela I.

Após confirmação da amplificação por visualização em gel de agarose a 2% (p/v), procedeu-se à mistura do DNA das estirpes controlo e mutadas. A mistura foi aquecida a 95°C durante 5 minutos para desnaturação dos fragmentos de DNA. Posteriormente, reduziu-se a temperatura para haver um arrefecimento lento que promove a renaturação. Este passo fornece as condições óptimas para a formação de homoduplexes e heteroduplexes.[14,15]

Análise por DHPLC
As amostras foram injectadas no sistema WAVE Nucleic Acid Fragment Analysis System (WAVE System, Transgenomic, Inc., Omaha, Nebraska), transportadas por uma corrente de soluções tampão (A: contém 0,1 M acetato de trietilamónio (TEAA), pH 7; B: contém 0,1 M de TEAA em 25% acetonitrilo) e conduzidas por uma bomba de alta pressão que existe no reservatório dos mesmos formando uma fase líquida móvel que fica adsorvida à matriz da coluna existente no sistema. A proporção dos tampões A e B e as temperaturas de formação dos duplexes foram reguladas automaticamente pelo sistema WAVE (tabela II).

A separação dos fragmentos de DNA foi registada pelo detector UV do sistema a 260 nm e os resultados apresentados sob a forma de cromatogramas que correspondem aos fragmentos de DNA separados. Em primeiro lugar, são detectados os heteroduplexes, uma vez que estes ficam menos tempo retidos na coluna pois desnaturam mais cedo do que os homoduplexes e, por isso, eluem mais cedo (de acordo com Transgenomic, Inc. User's manual).

Resultados da análise por DHPLC
As estirpes selvagens são homoduplexes e normalmente aparecem representadas por um único pico cromatográfico devido à existência de complementariedade completa entre as cadeias de DNA. Os heteroduplexes representam as estirpes mutadas e aparecem sob a forma de picos aberrantes com diferentes tempos de retenção.[14,15]

/ Resultados

A análise dos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* por DHPLC permitiu identificar a presença de mutação nas 83 amostras resistentes. Verificou-se que estas apresentavam picos cromatográficos aberrantes, enquanto que as estirpes selvagens, usadas como controlo, eram representadas por um pico cromatográfico único.

Inicialmente foi necessário fazer a optimização da temperatura da coluna e da percentagem de tampão B, de modo a obter perfis que permitissem distinguir as estirpes mutadas das não mutadas. Feita a optimização, verificou-se, para cada gene, perfis relativamente semelhantes mas muito diferentes dos perfis observados na estirpe de referência. O tempo de formação dos picos variou sempre entre 3,5 a 6 minutos.

Na tabela III apresentam-se as mutações encontradas nos 3 genes previamente estudados por sequenciação. A técnica de DHPLC permitiu detectar essas mesmas mutações. Relativamente ao gene *katG*, as 11 estirpes estudadas apresentavam a mesma mutação ($S_{315}T$). Os picos cromatográficos obtidos por DHPLC foram muito semelhantes entre si (Figura 2). Para as 30 estirpes estudadas para o gene *inhA*, os resultados foram muito semelhantes na medida em que, para amostras sequenciadas com a mesma mutação ($C_{-15}T$), os perfis cromatográficos de DHPLC foram também similares (Figura 3). Finalmente, para o gene *rpoB* verificou-se, por sequenciação de DNA, que das 42 estirpes estudadas, 34 apresentavam a mutação $S_{531}L$ e 8 apresentavam a mutação $D_{516}V$. A análise por DHPLC destas estirpes evidenciou o facto destas estarem mutadas em regiões diferentes, aparecendo, para cada caso, picos cromatográficos diferentes (Figura 4).

Em suma, os resultados obtidos por DHPLC concordaram em absoluto com os resultados da técnica clássica de sequenciação, tendo sido possível detectar a mutação nos 3 genes em 100% das amostras estudadas.

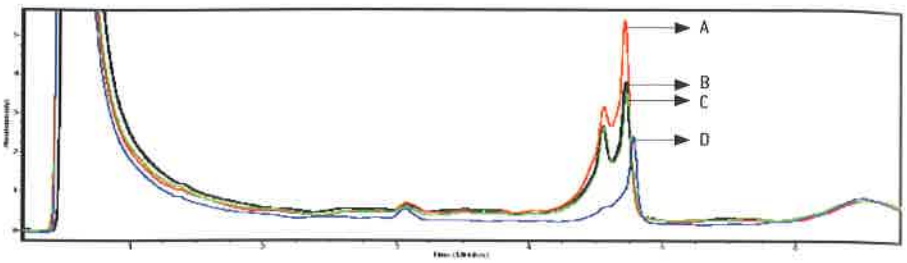


Figura 2 – Cromatograma representativo da mutação $S_{315}T$ no gene *katG* (A, B e C), e da estirpe selvagem (D).

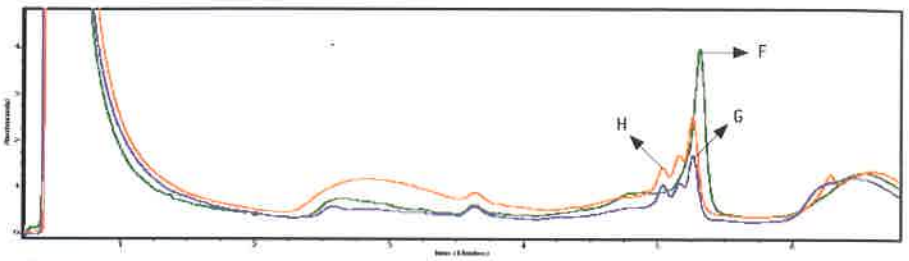


Figura 3 - Cromatograma representativo da mutação $C_{-15}T$ no gene *inhA* (G e H) e o perfil cromatográfico de uma estirpe selvagem (F).

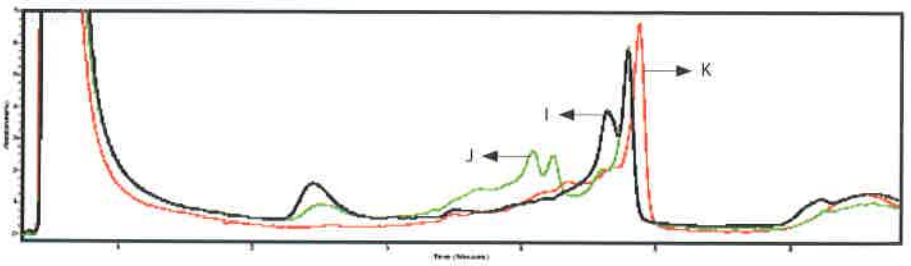


Figura 4 – Cromatograma representativo das mutações no gene *rpoB* em que J representa a mutação D516V e I representa a mutação S531L. K diz respeito à estirpe selvagem.

/ Discussão

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a técnica de DHPLC pode ser aplicada às estirpes de *M. tuberculosis* isoladas em Portugal, uma vez que obtivemos concordância absoluta entre os resultados obtidos por DHPLC e sequenciação automática. O método de DHPLC permitiu detectar mutação nos 3 genes estudados. No entanto, não identifica qual a mutação responsável pela resistência aos antibacilares. Este facto, pode ser considerado uma limitação da própria técnica que, embora seja significativamente mais rápida para o diagnóstico presuntivo, necessita de uma análise por sequenciação para detectar a mutação em causa.

Estudos anteriores mostraram a mesma tendência, tendo também conseguido detectar polimorfismos nos genes micobacterianos associados às diferentes resistências.[14,15]

É importante referir que a técnica de DHPLC também já foi utilizada para o estudo de mutações nos genes de outras bactérias (nomeadamente a *Neisseria gonorrhoeae* e a *Salmonella entérica*) que impedem a acção de agentes antimicrobianos.[17,18]

TABELA III – POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS, ISONIAZIDA E RIFAMPICINA

Gene	Proteína afectada	Substituição do aminoácido	Comentário
katG	Catalase peroxidase	$S_{315}T$	Apenas surgiu em 27% dos casos em que se verificou resistência a isoniazida
inhA	Enoil ACP redutase NADH- dependente	$C_{-15}T$	Surgiu em 73% dos casos em que houve resistência a isoniazida
rpoB	Subunidade ß da RNA polimerase	$D_{516}V$	Esta mutação surgiu em 18% dos casos
		$S_{531}L$	Esta mutação surgiu em 82% dos casos

Verificou-se que, apesar de ser um screening genotípico útil para detecção de mutações associadas a resistência, devem ainda continuar a efectuar-se ensaios fenotípicos de susceptibilidade, uma vez que nem todos os mecanismos de resistência estão devidamente caracterizados podendo nem sequer existir ensaios genotípicos disponíveis[15]. Por outro lado, o uso desta tecnologia não permite, por enquanto, a substituição da sequenciação automática do DNA que, actualmente, é a única que permite identificar a mutação no gene responsável pela resistência aos antibacilares.

De um modo geral, podemos afirmar que a técnica de DHPLC permite acelerar o diagnóstico, na medida em que conseguimos identificar, de uma forma mais rápida e económica, a presença da mutação e, consequentemente, as estirpes resistentes. Este estudo poderá ainda permitir a aplicação de uma terapêutica eficaz, logo no início da doença, prevenindo terapêuticas inadequadas que potenciam o aparecimento de estirpes resistentes. A nível de execução apresenta inúmeras vantagens: permite a injecção automática das amostras e a recuperação das mesmas através da utilização de um colector; reduz os custos, por utilizar pequenos volumes e por poder substituir o gel de agarose na avaliação das reacções de amplificação dos produtos de PCR, (procede-se à injecção dos mesmos na coluna de DHPLC a uma temperatura de 50ºC, à qual o DNA mantém a sua estrutura em cadeia dupla).[14,15]

Por todas estas razões, considera-se que a técnica de DHPLC é uma excelente metodologia a ser usada no despiste de mutações em genes associados à resistência de estirpes *M. tuberculosis*.

/ Bibliografia

1. Rieder HL. Epidemiologic Basic of Tuberculosis Control [monografia na Internet]. Paris: IUATLD; 1999. [acesso em 1999 Jul]. Disponível em: http://www.iuatld.org/pdf/en/guides_publications/epidemiologic_basis.pdf

2. World Health Organisation. Antituberculosis drug resistance in the World. 2004; Report no. 3. WHO/HTM/TB/2004.343

3. Collins HL, Kaufmann SH. The many faces of host response to tuberculosis. Immunol. 2001; 103(1): 1 - 9.

4. Sudre P, ten Dam G, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. Bull World Health Organ. 1992; 70(2): 149 - 159.

5. Eltringham IJ, Drobnieswski F. Multiple drug resistant tuberculosis: etiology, diagnosis and outcome. Br Med Bull. 1998; 54 (3): 569-78.

6. Antunes ML, Aleixo-Dias J, Antunes AF, Pereira MF, Raymundo E, Rodrigues MF. Anti-tuberculosis drug resistance in Portugal. Int J Tuberc Lung Dis. 2000; 4 (2): 223-31.

7. Constant CA, Ferreira PB, Valadas E, Antunes F. Tuberculose Multirresistente. Acta Med Port. 2004; 17:157-166.

8. Glynn JR. Resurgence of tuberculosis and the impact of HIV infection. Br Med Bull. 1998; 54(3): 579 - 93.

9. Aziz MA, Wright A. World Health Organization/International Union against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on Surveillance for anti-tuberculosis drug resistance: A model for other infectious disease. Clin Infect Dis. 2005; 41 Suppl 4: S258-62.

10. Carlos Gomes. O Problema de Multirresistência. In: Edições técnicas (Lidel). Lisboa: Lidel; 2000. 513-528

11. World Health Organisation. Global Tuberculosis programme: Guidelines for the management of drug - Resistance Tuberculosis 1997; 210. WHO/TB/96.210 Rev.1

12. Zhang Y, Telenti A. Genetics of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Hatfull GF, Jacobs WR. Molecular Genetic Mycobacteria. Washington DC: ASM Press; 2000. 235 - 254.

13. Stephen HG. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46 (2): 267-274.

14. Shi R, Otomo K, Yamada H, Tatsumi T, Sugawara I. Temperature-mediated heteroduplex analysis for the detection of drug-resistante gene mutations in clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis* by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. Microbes Infect. 2006; 8(1): 128-35. Epub 2005 Agust 10.

15. Cooksey CR, Morlock PG, Holloway PB, Limor J, Hepburn M. Temperature-Mediated Heteroduplex Analysis Performed by using Denaturing High-Performance Liquid Chromatography to identify sequence polymorphisms in *M. tuberculosis* complex organisms. J Clin Microbiol. 2002; 40 (5); 1610 - 1616.

16. Molina AL, Tobo PR. Uso das técnicas de biologia molecular para o diagnóstico. Einstein. 2004; 2 (2): 139-142.

17. Shigemura K, Shirakawa T, Okada H, Tanaka K, Udaka T, Kamidono S, et al. Rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations in fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* by denaturing high-performance liquid chromatography. J Microbiol Methods. 2004; 59 (3): 415-421.

18. Eaves DJ, Liebana E, Woodward MJ, Piddack LJV. Detection of *gyrA* mutations in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica* by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. J Clin Microbiol. 2002; 40 (11); 4121-4125.