

Detecção de mutações nos genes *katG*, *rpoB* por hibridização reversa em DNA de *Mycobacterium tuberculosis* diretamente em amostras de pacientes com tuberculose

MARTINS, C.A.¹; FERREIRA, S.³; BELLO, G.L.²; ATLE, M.A.²; LINCK, N.³; SCHERER, L.^{3,4}; SUSANA, M.^{3,4}; ROSSETTI, M.L.^{5,6}

¹ Graduação em farmácia/ULBRA, ² Graduação em Biomedicina/ULBRA, ³ Pesquisador colaborador; ⁴ PPGTA/ULBRA; ⁵ CDCT/FEEPS, ⁶ Coordenador projeto pesquisa.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (figura 1) que representa um sério problema de saúde pública no mundo.

O tratamento da TB consiste em uma associação de fármacos, principalmente rifampicina (RMP) e isoniazida (INH) por um período de no mínimo seis meses. O aumento de cepas resistentes a esses fármacos é preocupante, uma vez que são poucos os fármacos disponíveis. A resistência a INH e RMP está relacionada a mutações específicas em diferentes genes.

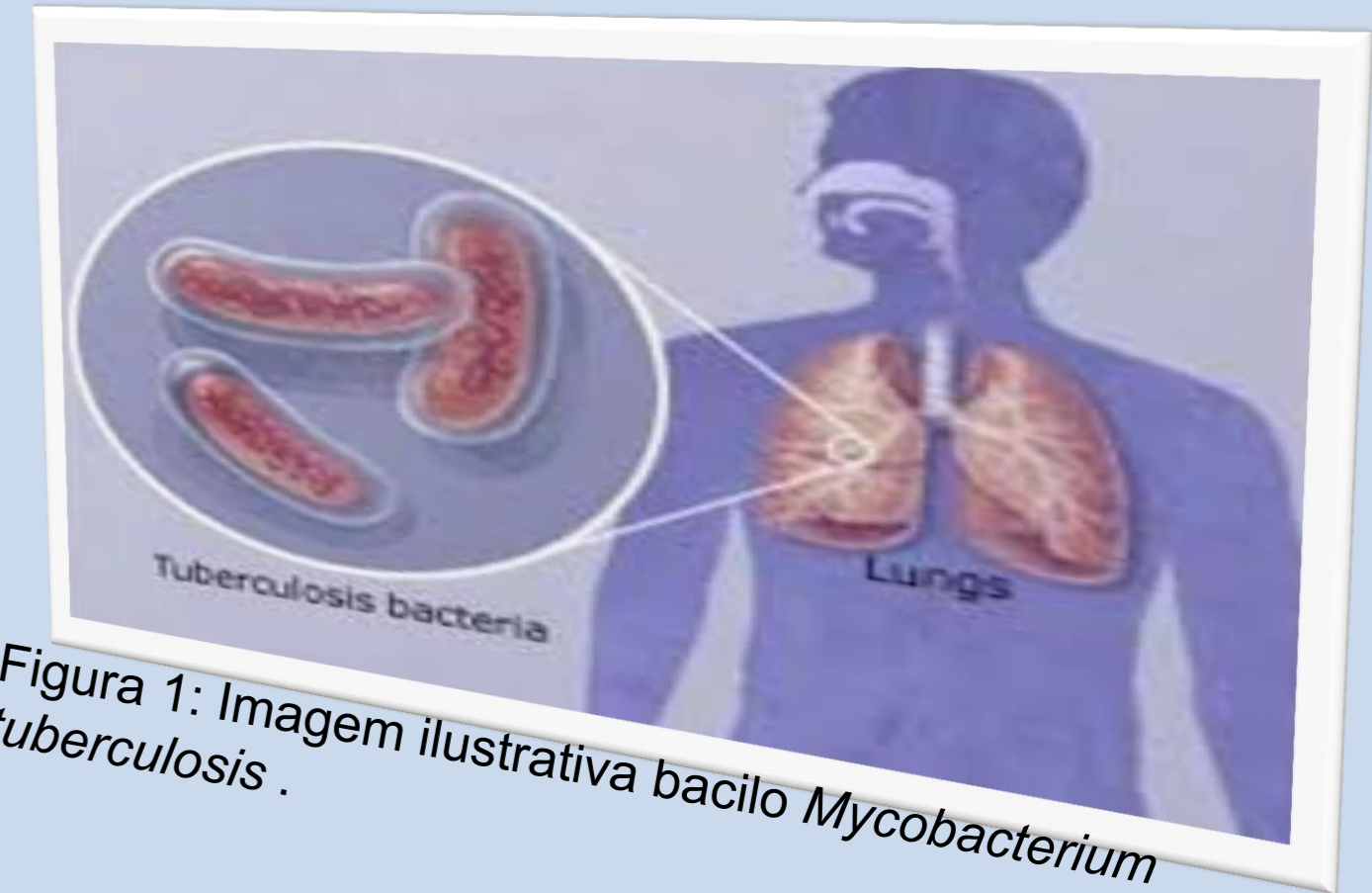


Figura 1: Imagem ilustrativa do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*.

Cerca de 95% das cepas resistentes a RMP possuem mutações, inserções ou deleções dentro de uma região de 81 pb do gene *rpoB* que codifica a sub-unidade β da RNA polimerase, resultando na inibição da transcrição (figura 2).

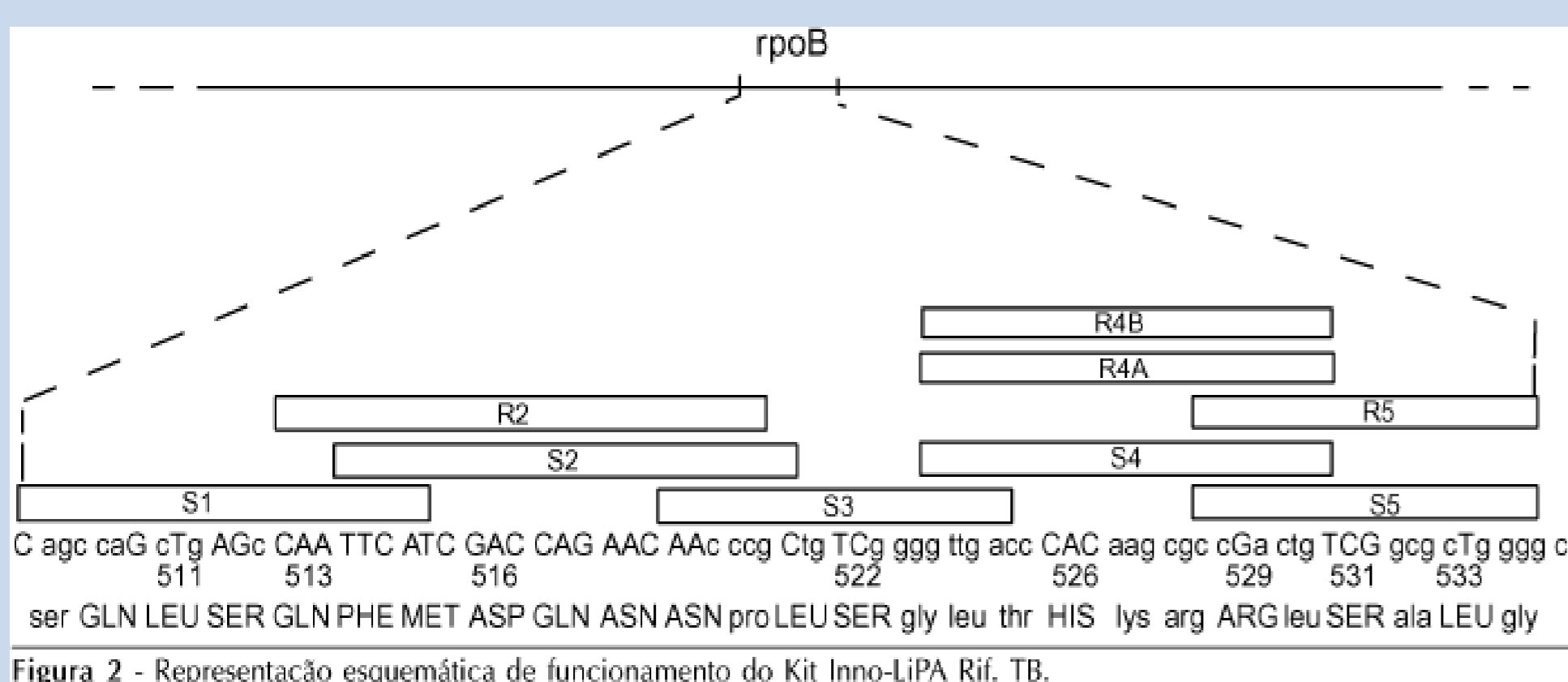


Figura 2 - Representação esquemática de funcionamento do Kit Inno-LiPA Rif. TB.

A resistência à INH está relacionada a diferentes genes envolvidos com a síntese de ácidos micólicos da parede celular. A maioria das mutações são nos genes *katG*, principalmente no códon 315 (Ser → Thr) e na região regulatória C (-15) T do gene *inhA*. O tratamento da tuberculose causada por cepas resistente seria mais eficaz se fosse realizado após os testes de suscetibilidade da bactéria aos fármacos. No entanto, os métodos microbiológicos são laboriosos e demorados, sendo comum ter que aguardar até mais de quatro semanas para obtenção do resultado.

OBJETIVO

Analisar a presença de mutações em regiões de DNA de *M. tuberculosis* envolvidas com essa resistência através de hibridização com sondas para os genes *katG*, *rpoB*.

METODOLOGIA

As sondas para a região do genes *rpoB* e *katG* que estão relacionadas a mutações que conferem a resistência a RMP e INH foram fixadas em membrana de náilon para hibridizar com o produto de um PCR multiplex realizado com *primers* específicos destes dois genes. A hibridização foi detectada através de um sistema enzimático que formava um precipitado de cor púrpura. Os DNAs testados foram extraídos diretamente de escarro de pacientes diagnosticados com TB no município de Canoas e os resultados comparados com o teste de Sensibilidade (TS).

RESULTADOS

Até o momento, foram testadas 10 cepas do *Mycobacterium tuberculosis* pelo método de hibridização em membranas. Das 8 cepas sensíveis à RMP segundo o teste de sensibilidade (TS), 7 hibridizaram corretamente em todas as sondas selvagens do gene *rpoB* sendo possível detectar o sinal de hibridização. Uma delas não hibridizou com uma das sondas detectando uma possível mutação. Duas cepas resistente a RMP foram também resistentes no teste pois, não hibridizaram na região selvagem do códon 531. As seis cepas sensíveis a INH também foram sensíveis no teste considerando que hibridizaram com a sonda selvagem que identificava a mutação no gene em *katG*. Das quatro cepas resistentes a INH, duas delas não foi possível visualizar uma hibridização na sonda do gene *katG*, indicando mutação nessa posição. Em duas, houve hibridização na região selvagem, mesmo sendo resistente a INH.

CONCLUSÃO

Apesar dos resultados serem muito preliminares, são promissores. A discordância encontrada pode ser explicada pelo fato de que existam outras regiões gênicas envolvidas e também outros mecanismos de resistência como as bombas de efluxo e a permeabilidade da membrana. As cepas discordantes serão submetidas ao sequenciamento para posterior análise.

Bibliografia:

JÚNIO, R, S. L. M. F. **Identificação das mutações mais frequentes relacionadas com a resistência a rifampicina e isoniazida em *mycobacterium tuberculosis* nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* através de método molecular com detecção colorimétrica.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do SUL, Porto Alegre, 2012.