

Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Lorena Cristina Santos

Caracterização molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia-GO, pela técnica de RFLP-IS6110

Orientador: André Kipnis

Co-orientadora: Ana Paula Junqueira Kipnis

Dissertação de Mestrado

Goiânia-Go, 2008

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Lorena Cristina Santos

Caracterização molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia-GO, pela técnica de RFLP-IS6110

Orientador: André Kipnis

Co-orientadora: Ana Paula Junqueira Kipnis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Tropical

Goiânia-GO, 2008

**Trabalho realizado no Laboratório de
Bacteriologia Molecular do
Departamento de Microbiologia do
Instituto de Patologia Tropical e Saúde
Pública da Universidade Federal de
Goiás sob orientação do Dr. André
Kipnis**

***“Se podemos sonhar, podemos
tornar nossos sonhos realidade”
(Walt Disney)***

***Dedico aos meus pais, Luiz e Mara, e
aos meus irmãos, Luciana e
Leandro, por acreditarem em mim,
mais que eu mesma!***

Agradecimentos

A gratidão é uma das mais belas virtudes de um ser humano.

Á **Deus**, por nunca faltar na minha vida, sempre me protegendo mesmo nas horas em que eu O esquecia. Pelas oportunidades, pelas vitórias, e até pelas derrotas, pois foram elas que me ensinaram a fazer diferente, e certo!

Ao Professor, mestre e amigo **André Kipnis**. Pela paciência, compreensão, profissionalismo, confiança, dedicação e acima de tudo, pelos ensinamentos, que não ficaram resumidos apenas à ciência.

As amigas do Laboratório de Bacteriologia Molecular que caminharam junto comigo durante todo o percurso. **Camila Xavier, Alessandra Marques e Suely Alves** vocês, tornaram os dias de trabalho bem mais satisfatórios. A alegria do nosso laboratório foi essencial para a realização dos experimentos com mais prazer. Obrigada pelos favores, pelo apoio, confissões, sorrisos e carinho.

Aos novos estagiários do laboratório que também já estão se tornando grandes amigos.

Ao **Hernane Bahia**! Todos os "muito obrigado" que eu te falar não serão suficientes para agradecer tudo que fez para a concretização deste trabalho. Obrigada pelas horas de convivência, que a todo e qualquer momento foram repletas de alegria e gargalhadas. Obrigada pelas inúmeras ajudas prestadas, pela paciência, pelas idéias malucas que no fim sempre

davam certo... Com você aprendi muito mais que ensinei! Você faz uma enorme falta no nosso laboratório!

Ao Prof. **Luiz Artur Mendes Bataus**, por me ensinar a dar os primeiros, e essenciais, passos dentro da ciência. Pelas oportunidades criadas e o incentivo dado.

Aos meus eternos amigos **Ângela Viegas, Angele Resende, Fernanda Lima, Gabriel Muylaert, José Parreira Neto e Natália Carvalhaes**. Amigos são a família que Deus nos permite escolher. Obrigada pela amizade incondicional, pela presença mesmo que em silêncio, pela cumplicidade, respeito, tolerância, pela irmandade! Obrigado por tudo que já passamos juntos, pelas lembranças que guardo com carinho. Obrigada simplesmente por vocês existirem e fazerem parte da minha vida e da minha história.

Ao **Georthon Pessoni de Moura**, por me dar amor, carinho, compreensão, apoio, sugestões e principalmente, por me fazer feliz!

Ao **Fausto Bruno**, e ele sabe que não é só pela grande amizade, mas porque sem ele talvez meu trabalho não estivesse sendo concluído hoje.

À Professora **Maria Cláudia D. B. P. André**, pela ajuda na análise dos dados, um muito obrigado muito especial. A Professora **Ana Lúcia S. S. Andrade** pelo empréstimo do programa.

À Professora **Ana Paula Junqueira-Kipnis** pelas sugestões, atenção e cooperação.

Aos funcionários do Hospital de Doenças Tropicais e Laboratório Central Dr. Giovanni Cysneiros pela cooperação. **Hilda, Ivanísio, Heberston e Gasparina**, sem a colaboração de vocês nada disso teria sido realizado. Obrigado pela cooperação, pela paciência e pelo aprendizado.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicado à Micobactérias do Instituto Oswaldo Cruz, em especial ao **Philip Noel Suffys** e ao **Diogo Neto Santos** pela atenção e colaboração.

Aos funcionários do IPTSP. Em especial ao **José Clementino (Zezinho), Kariny Vieira e Maria do Socorro**, pelo carinho e atenção.

Aos funcionários do **Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás** pela cooperação na execução da técnica.

Aos professores da banca de qualificação e defesa **Fabiana Cristina Pimenta e José Daniel Gonçalves Vieira, Luiz Arthur Mendes Bataus e Marcelo de Marcelo Brígido** pelas sugestões.

A **CAPES** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

Em especial... á **minha família!** Pelo orgulho que sempre sentiram de mim, pelos incontáveis elogios, pela torcida, pela confiança... enfim, por vocês serem A MINHA FAMÍLIA!

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

Lista de abreviaturas

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido-Resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
°C	Graus Celsius
CMT	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DR	Repetição Direta
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Aceleração da gravidade
GC	Guanina-Citosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
H37Rv	Cepa padrão de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
IS	Seqüência de inserção
Kb	Kilobases
LB	Lúria-Bertani
LJ	Lowestein-Jensen
MDR-TB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Multi-droga resistente
MIRU	Unidades repetitivas interceptadas de micobactérias
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PGRS	Polimorfismo de seqüências repetitivas ricas em GC
PNB	Ácido p-nitrobenzóico
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TB	Tuberculose
TCH	Ácido tiofeno-2-carboxílico
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
tRNA	Ácido ribonucléico transportador
VNTR	Variável Número de Repetições em Tandem

X-Gal

5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

Resumo:

A tuberculose é um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Foi demonstrado que diferentes cepas de *M. tuberculosis*, caracterizadas pela técnica padrão mundial, RFLP-IS6110, possuem diferentes graus de virulência e resistência a antibióticos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em dois serviços de referência na cidade de Goiânia-Goiás no período de janeiro de 2006 a junho de 2007, utilizando a técnica RFLP-IS6110. Foram processadas para cultura 175 amostras de escarro com baciloscopias positivas e um total de 142 culturas positivas para *M. tuberculosis* tiveram seus DNA extraídos, estes foram posteriormente submetidos a técnica de *southern blotting* para obtenção de seus perfis de bandas de RFLP-IS6110. Destas, 126 amostras apresentaram um perfil de RFLP-IS6110 de fácil comparação de similaridade no programa BioNumerics (versão 4.0). As amostras analisadas pelo RFLP-IS6110 permitiram o agrupamento de 43% das amostras em 24 *clusters*, sugerindo transmissão recente entre indivíduos agrupados, contudo estes pacientes não apresentaram nenhuma relação epidemiológica, sugerindo possíveis transmissões casuais entre membros de um mesmo *cluster*. Quando comparamos as amostras com linhagens MDR descritas na literatura, três se agruparam no *clado* formado pelas famílias virulentas. Este estudo fortaleceu a importância de se traçar cadeias de transmissões bem como a necessidade de se manter um controle de imigrantes e emigrantes visto que há a possibilidade de disseminação de cepas resistentes.

Abstract:

Tuberculosis is a serious public health problem all over the world. It has been demonstrated that different *M. tuberculosis* strains, characterized by the RFLP-IS6110 standard technique, have different virulence properties and antibiotic resistance. The aim of this study was to characterize *M. tuberculosis* strains isolated from patients attending two state reference hospitals of Goiânia-Goiás, using the RFLP-IS6110 technique. Positive cultures of *M. tuberculosis* sampled and isolated from January 2006 to June 2007 had their DNA extracted. A total of 142 viable DNA samples were analyzed, of which 126 samples presented an RFLP-IS6110 profile. Similarities comparisons between samples, as well as with literature reported profiles, were done with Bionumerics software (version 4.0). Forty three percent of the samples could be grouped in 24 clusters, when analyzed by the RFLP method, suggesting recent transmission among individuals belonging to the same *cluster*, however those patients did not present any epidemiological relationship, suggesting possible casual transmission between members of the same cluster. When compared with strain profile of the MDR-TB, three samples had grouped in the clade formed by families virulent. This study strengthens the importance of determining transmission routes not only within the state of Goiás but in the entire country, since there is the possibility of resistant strains transmissions.

Sumário

Sumário

1- Introdução.....	1
2- Revisão de literatura.....	5
2.1- O gênero <i>Mycobacterium</i>	5
2.2- Epidemiologia da tuberculose.....	6
2.3- Epidemiologia molecular da tuberculose.....	7
2.3.1- Métodos baseados na análise de polimorfismo do DNA através de fragmentos de restrição.....	10
2.3.1.1- Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP).....	10
2.3.1.2- RFLP seguido de hibridização com sonda IS6110.....	10
2.3.1.3- Polimorfismo de seqüências repetitivas ricas em GC (PGRS).....	12
2.3.2- Métodos baseados na análise de polimorfismo através da amplificação de DNA por reação da polimerase em cadeia (PCR).....	12
2.3.2.1- <i>Spoligotyping</i>	13
2.3.2.2- Número variável de repetições em tandem (VNTR).....	14
2.3.3- Análise comparativa das diferentes técnicas de tipagem molecular.....	16
2.3.4- Comparação de tipagens por RFLP-IS6110.....	17
2.3.5- Justificativa.....	19
3- Objetivos.....	21
4- Material e métodos.....	22
4.1- Seleção das amostras.....	22
4.2- Baciloscopia.....	22
4.3- Cultura.....	22
4.4- Identificação da espécie <i>M. tuberculosis</i>	23
4.5- Extração de DNA das culturas de <i>M. tuberculosis</i>	23
4.6- Clonagem da seqüência de inserção IS6110.....	24
4.7- Preparação das amostras de DNA e transferência.....	25

4.8- Marcação da sonda.....	25
4.9- Hibridização e detecção.....	26
4.10- Análise dos perfis de RFLP.....	26
4.11- Análise dos dados epidemiológicos.....	27
5.0- Resultados.....	28
5.1- Análise dos dados epidemiológicos (EpiInfo).....	28
5.2- PCR da região interna do elemento de inserção IS6110.....	30
5.3- Clonagem do fragmento de inserção IS6110 no plasmídeo pGemT-Easy.....	31
5.4- Extração de DNA das amostras coletadas.....	32
5.5- Perfil de RFLP das amostras.....	32
5.6- Análise do padrão de bandas dos perfis de RFLP-IS6110....	33
5.7- Comparação dos perfis de RFLP-IS6110 com linhagens da Família Beijing.....	36
6.0- Discussão.....	39
7.0- Conclusões.....	44
8.0- Referências Bibliográficas.....	45
9.0- Apêndice.....	60
Anexos I.....	65
Anexo II.....	67

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 Gráfico representativo dos estados de origem dos pacientes positivos para *Mycobacterium tuberculosis*

Figura2 Gel de agarose do produto da amplificação da seqüência de inserção IS6110.

Figura 3 Gel de agarose da clonagem do fragmento de inserção IS6110 no plasmídeo pGemT- easy.

Figura 4 Imagem de uma auto-radiografia contendo o RFLP-IS6110 de 15 amostras de *Mycobacterium tuberculosis*

Figura 5 Dendograma obtido com a análise de similaridade das amostras através do perfil de bandas de RFLP-IS6110.

Figura 6 Número de isolados de *M. tuberculosis* agrupados em um mesmo *cluster*

Figura 7 Freqüência do número de cópias de IS6110 por linhagem de *M. tuberculosis*

Figura 8 Dendograma obtido a partir da comparação das amostras com linhagens da literatura.

Figura 9 Parte do dendograma obtido com a comparação das amostras com linhagens da literatura demonstrando o Clado de linhagens MDR-TB

Tabela 1 Características epidemiológicas dos 142 pacientes com cultura positiva para *M. tuberculosis*

Introdução

1. Introdução:

A tuberculose (TB) ainda é um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Devido à redução dos investimentos durante duas décadas, quando se acreditou que a doença estava sob controle, e o advento da AIDS/HIV, ocorreu o aumento da transmissão do *Mycobacterium tuberculosis* em proporções alarmantes, consistindo em uma das principais causas de mortes por doença infecciosa. Tal foi a preocupação que a Organização Mundial de Saúde (OMS) anunciou, em 1993, a tuberculose como emergência global, e desde então vem desenvolvendo políticas para o seu controle. Tem-se estimado que um terço da população mundial esteja infectado com *M. tuberculosis* resultando em dois milhões de mortes anualmente (Anthony *et al.* 2005).

No Brasil, estima-se que, mais de 50 milhões de pessoas estão infectadas, com aproximadamente 100 mil novos casos de tuberculose por ano. O número de mortes pela doença, em nosso meio, é de 5 a 6 mil anualmente (Bloom *et al.* 1992; Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde 14/08/2006), apresentando o maior número de casos da América Latina (Natal *et al.* 2003; Rossetti *et al.* 2002). De acordo com o relatório do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde de 2006, a região Centro-Oeste concentra 4,36% dos casos do país, com uma incidência de quase 40/100 mil habitantes, em 2004, sendo que o estado de Goiás totalizou 17,8/100 mil habitantes (Ministério da Saúde 2006).

A manutenção dos elevados índices de morte por tuberculose está estreitamente relacionado com a prevalência da doença em pacientes HIV positivo. Antes do advento da AIDS, a grande maioria das infecções pelo *M. tuberculosis* permaneciam latentes no hospedeiro, às custas de uma resposta imunológica celular eficaz. No entanto a disseminação da infecção pelo HIV no mundo levou a alterações nos mecanismos de defesa contra o agente causal da tuberculose, tornando a infecção pelo HIV o maior fator de risco para a progressão da infecção latente pelo *M. tuberculosis* (Boffo 2004).

Apesar de o agente causador da tuberculose humana ser altamente infectante, sua capacidade em desenvolver doença clínica é relativamente baixa. Estima-se que apenas 10% das pessoas infectadas tornam-se doentes.

Os fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença não foram totalmente elucidados, mas, de maneira geral, eles são atribuídos a uma relação entre fatores ambientais, características do hospedeiro e a fatores genéticos do patógeno (Boffo 2004).

Fatores sociais como pobreza, desnutrição, estresse, superpopulação e exposição a micobactérias ambientais influenciam a susceptibilidade à tuberculose, características típicas de nações em desenvolvimento (Baptista *et al.* 2002; Collins 1989; Nardell 1989). Dormans e colaboradores (2004) demonstraram que infecções por diferentes linhagens podem apresentar cursos diferentes de infecção, resposta imune do hospedeiro, bem como virulência. Contudo, existem evidências de que uma predisposição genética multifatorial, além de fatores como idade, estado imunológico do indivíduo, doenças concomitantes e outros fatores de resistência do hospedeiro estejam associados (Fernando *et al.* 2006; Hill 1998).

Adicionalmente, a emergência e disseminação de linhagens de *M. tuberculosis* multiresistentes a drogas (MDR-TB) também se tornaram sérias ameaças para o controle da tuberculose no novo milênio. A falta de novos agentes terapêuticos para a MDR-TB, associado a uma necessidade de desenvolver ferramentas de diagnóstico molecular eficientes tem estimulado, nos últimos anos, o delineamento das bases genéticas moleculares da resistência às drogas do *M. tuberculosis* (Andrews *et al.* 2007; Ramaswamy *et al.* 2004).

A identificação de linhagens se torna útil como uma ferramenta adicional em investigações epidemiológicas, pois é um meio de elucidar os mecanismos que influenciam na dinâmica de transmissão e na identificação dos fatores de risco em uma comunidade. Esta identificação pode permitir a elaboração de um modelo de medidas de controle adequado (Baptista *et al.* 2002; Maguire *et al.* 2002), além de poder ser usada para investigar propriedades biológicas das linhagens como virulência (Kato-Maeda *et al.* 2001).

Algumas das principais características epidemiológicas que são elucidadas com estas técnicas moleculares podem ser exemplificadas como: na determinação da origem de uma infecção em um paciente (familiar ou comunitária), na disseminação e a detecção precoce de organismos que adquiriram resistência a antibióticos (Alland *et al.* 1994; Edlin *et al.* 1992), na

discriminação da doença endógena de exógena (Chaves *et al.* 1999; Moro *et al.* 1998), casos de contaminação cruzada em laboratório (Carricajo *et al.* 1999), além de avaliar fatores de risco específicos de cada linhagem e possíveis diferenças fenotípicas destas, como virulência, tropismo por determinado órgão e transmissibilidade (Mathema *et al.* 2006; Rhee *et al.* 1999; Valway *et al.* 1998).

Várias técnicas baseadas na análise do DNA bacteriano foram desenvolvidas nos últimos vinte anos, como a análise de polimorfismo após digestão por enzima de restrição (RFLP), RFLP seguido de hibridização com sondas (IS6110, IS1081, elementos repetitivos ricos em GC), *spoligotyping* e Número Variável de Repetições em Tandem- Unidades Repetitivas Interceptadas de Micobactérias (MIRU-VNTR) entre outros (Kanduma *et al.* 2003).

Apesar da grande diversidade de técnicas, a técnica de RFLP seguida de hibridização com a sonda do elemento de inserção IS6110 foi escolhida como técnica de padrão mundial, para que todos pudessem correlacionar seus resultados. Os dados obtidos dessa análise esclarecem importantes mecanismos em relação à transmissão global da tuberculose além da identificação de linhagens com propriedades particulares como alta infectividade, maior virulência e/ou multiresistência a drogas, bem como esclarecer questões a respeito da eficácia da vacina BCG e a frequência de reativação versus reinfecção, as quais são dados importantes no aspecto da pandemia da AIDS (van Embden *et al.* 1993). Suffys e colaboradores (2000) ainda, afirmam o valor de IS6110-RFLP como uma ferramenta adicional de estudos epidemiológicos de TB no Brasil.

A técnica do RFLP-IS6110 também se mostra útil na diferenciação de espécies de micobactérias. O tempo necessário para diferenciação de espécies de *Mycobacterium sp.* utilizando testes bioquímicos e características de crescimento podem ser extremamente reduzidos com a combinação da análise do RFLP-IS6110 com testes de atividade da pirasinamidase, para diferenciar *M. bovis* que carecem da atividade da pirasinamidase com *M. tuberculosis* e *M. africanum*. Dessa maneira, a análise do RFLP-IS6110 pode ser útil tanto na identificação de espécies quanto na avaliação de aspectos epidemiológicos (van Soolingen *et al.* 1994).

Diante do exposto, o presente estudo compreendeu a coleta de amostras que foram realizadas no Hospital de Doenças Tropicais de Goiás-HDT e no Centro de Referência de Diagnóstico e Terapêutica de Goiânia, no período de janeiro de 2006 a junho de 2007, onde encontramos pacientes de diversas localidades do estado de Goiás bem como do Brasil, assim como a realização dos procedimentos de baciloscopia. As culturas foram realizadas no Laboratório Central Giovanni Cysneiros (LACEN-GO) e os demais procedimentos no Laboratório de Bacteriologia Molecular no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.

Revisão de literatura

2. Revisão da Literatura:

2.1- O gênero *Mycobacterium*

A família *Mycobacteriaceae* consiste em um único gênero, *Mycobacterium*, contendo mais de 70 espécies, algumas das quais são patogênicas para humanos e animais, e outras são saprófitas (Grange 1996). São bacilos finos, ligeiramente curvos, não formadores de esporos. Muitas espécies de micobactérias são ubíquas, e podem ser encontradas na água, alimentos, solo e vegetação (Eisenstadt *et al.* 1995). Apresentam um crescimento relativamente lento, provavelmente pela grande quantidade de lipídeos presentes na parede celular, que dificultam a absorção de nutrientes. São bactérias aeróbias estritas, visto que várias evidências sugerem que a predileção de algumas destas pelos pulmões está relacionada com a tensão de CO₂ neste órgão (Eisenstadt & Hall 1995).

Adicionalmente, a composição da parede celular destas, proporciona a propriedade de álcool-ácido resistência formando complexos coloridos com os compostos derivados do trifenilmetano, que resistem à descoloração com álcool-ácido (Koneman EW 2001).

As micobactérias podem ser classificadas dentre as de crescimento rápido ou lento, e pigmentadas ou não-pigmentadas. As micobactérias de crescimento rápido requerem menos que sete dias para a visualização de colônias em meio sólido, compreendendo 56 espécies ubíquas (Pfyffer 2003). Em contrapartida, as de crescimento lento, mais frequentemente associadas às infecções em humanos, requerem até seis semanas para desenvolvimento de colônias em meios de cultura apropriados (Rosenzweig 1996).

Os membros cultiváveis do gênero *Mycobacterium* podem ser distinguidos em dois grupos: o complexo *M. tuberculosis* e as chamadas micobactérias atípicas, ou não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (Van Soolingen 2001).

Membros do complexo *M. tuberculosis* (CMT), formado pelas espécies geneticamente relacionadas *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* (Tsukamura 1983), *M. canetti* (Arnold 2007; Miltgen *et al.* 2002), *M. caprae* (Aranaz *et al.* 2003) e *M. pinnipedii* (Cousins *et al.* 2003), são os responsáveis

por causar tuberculose, contudo, apenas o *M. bovis* e o *M. tuberculosis* são encontrados no Brasil. Geneticamente, todos os membros deste complexo são extremamente similares apresentando 99,9% de identidade rRNA 16S (Chimara *et al.* 2004).

O *Mycobacterium tuberculosis* é o principal agente etiológico da tuberculose em humanos, representando a doença com maior número de casos de morte associados com um único agente infeccioso bacteriano (Murray *et al.* 1990).

2.2- Epidemiologia da tuberculose

A tuberculose é uma doença bacteriana crônica, infecto-contagiosa, que tem como agente etiológico, o *M. tuberculosis*, sendo descoberto em 1882 por Robert Koch, que isolou e descreveu o bacilo conseguindo cultivá-lo e reproduzir a doença em animais de laboratório (Schuster 1995). É uma das mais antigas doenças infecciosas do mundo, e apesar de possuir ferramentas efetivas para o controle e prevenção, a tuberculose é a mais freqüente causa de morte por um simples agente infeccioso em pessoas entre 15-49 anos, causando um total de 2-3 milhões de mortes anualmente (Enarson *et al.* 1999; Geiter 2000).

É transmitida de pessoa para pessoa pelo ar, através da emissão de gotículas contendo o *M. tuberculosis*. Estas gotículas potencialmente infectantes, são produzidas quando pessoas com tuberculose pulmonar ou de laringe tosem, espirram ou falam (Mims *et al.* 1999). Tem como principais sintomas: comprometimento do estado geral, tosse, inapetência, febre e emagrecimento. O período de incubação varia entre 6 e 12 meses após a infecção inicial (Ministério da Saúde 2004). Os casos de tuberculose ocorrem predominantemente no grupo etário economicamente mais produtivo com faixa etária entre 15 e 49 anos (Mathema *et al.* 2006).

Tem-se estimado que um terço da população mundial esteja infectada com *Mycobacterium tuberculosis* resultando em dois milhões de mortes anualmente (Anthony *et al.* 2005). A OMS em 1993 anunciou a tuberculose como emergência global e, desde então, vem desenvolvendo políticas para contê-la. Todavia, devido à redução dos investimentos em pesquisas durante duas décadas, desde a implantação da rifampicina na quimioterapia de curto prazo

para tuberculose na década de 60, quando se acreditou que a doença estava sob controle (Espinal 2003), juntamente com a combinação de fatores demográficos, movimentos populacionais, a expansão da epidemia do HIV e o aumento da resistência às drogas, a tuberculose atingiu proporções alarmantes e hoje é considerada como uma calamidade pública. Além do mais, estima-se que se a efetividade do controle da tuberculose não obter melhoras substanciais, o número de casos novos passará de 200 milhões em 2001 para perto de um bilhão de novas pessoas infectadas no ano de 2020 (Kanduma *et al.* 2003).

Aproximadamente 95% dos casos de tuberculose ocorrem em países em desenvolvimento, sendo que 22 países concentram 80% do total de casos. O Brasil está entre os principais países que registram esses casos, ocupando a 16ª posição entre as regiões com a maior prevalência doença, atingindo todas as faixas etárias. Juntamente com o Peru, o Brasil representou 50% de todos os casos da América Latina em 2002 (Oelemann *et al.* 2007; Organization World Health 2006). Nas últimas duas décadas, o Brasil registrou 42 milhões de infectados, com 112.000 óbitos (Ministério da Saúde 2004). O Estado de Goiás apresenta uma incidência anual de aproximadamente 18 casos a cada 100.000 habitantes (Ministério da Saúde 2006).

2.3- Epidemiologia molecular da tuberculose

Epidemiologia molecular é um campo que tem emergido primariamente da multidisciplinaridade oriunda da interação entre a biologia molecular, medicina clínica, estatística e epidemiologia clássica. Ela está focada sobre o papel da genética e dos fatores de risco ambientais, sobre o molecular/celular, na etiologia da doença e sua distribuição, propagação e disseminação entre a população. Isto é, concluir por associações entre características epidemiológicas e propriedades biológicas de isolados clínicos oriundos de indivíduos sintomáticos (Mathema *et al.* 2006).

Em meados dos anos 80, viu-se as primeiras integrações de métodos moleculares para a discriminação entre isolados de *M. tuberculosis* (Mathema *et al.* 2006). Os primeiros trabalhos para determinação de polimorfismo genético de *M. tuberculosis* utilizaram tipagem por fago. Mankiewicz and Liivak,

(1975) usaram esta técnica para analisar a heterogeneidade entre colônias individuais do bacilo obtidas de culturas isoladas de esquimós, chegando a conclusão de que 14,1% dos pacientes testados foram infectados simultaneamente com mais de uma linhagem de *M. tuberculosis*. Apesar de ter sido útil na época, esta técnica é limitada pelo número reduzido de tipos de fagos para *Mycobacterium spp.* e a baixa sensibilidade do método (Kanduma *et al.* 2003). Desta forma, o entendimento da propagação de linhagens específicas da tuberculose era imprecisa e baseava-se na observação de dados ou correlações.

Recentemente o genoma da cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* foi completamente seqüenciado. Observou-se que consiste de 4.4 mega pares de bases, circular, apresentando várias regiões codificantes densamente acumuladas, possuindo alto conteúdo guanina-citosina (GC-65,6%) (Mostrom *et al.* 2002).

O genoma é rico em DNA repetitivo, principalmente seqüências de inserção, que são pequenos elementos genéticos móveis, frequentemente menores que 2.5 Kb, amplamente distribuídos entre as bactérias (Mathema *et al.* 2006). Residem no genoma da cepa H37Rv, dezesseis cópias da seqüência de inserção IS6110 e seis cópias do elemento IS1081 dentre outras. Muitas destas seqüências parecem estar inseridas em regiões intragenômicas, ou, não-codificantes, frequentemente perto de genes tRNA e várias delas são agrupadas, sugerindo a existência de inserções “hot-spots” que impedem que os genes sejam inativados (Cole *et al.* 1998).

Visto que o genoma micobacteriano é bem conhecido, os estudos epidemiológicos da tuberculose puderam ser facilitados devido à aplicação de marcadores moleculares linhagem-específicos (van Embden *et al.* 1993). O desenvolvimento destas ferramentas utilizando DNA *fingerprint* tem permitido a distinção dessas linhagens. Quando duas ou mais linhagens têm o perfil *fingerprint* idêntico ou muito similar, elas são inferidas em um mesmo grupo (*cluster*). Com isso, linhagens isoladas de diferentes pacientes, mas pertencentes a um mesmo grupo, podem ter grandes probabilidades de serem epidemiologicamente associadas, isto é, podem refletir transmissão recente entre os pacientes (Goyal *et al.* 1997).

Dentre estas ferramentas, a análise do polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição seguidos de hibridização na seqüência de inserção IS6110 (IS6110-Restriction Fragment length polyimorphism-RFLP) é considerada atualmente a técnica padrão para a comparação de isolados de *M. tuberculosis* (van Embden *et al.* 1993). Outras técnicas, como *spoligotyping* (Kamerbeek *et al.* 1997) e, mais recentemente, a tipagem baseada no número variável de repetições em tandem (VNTRs- Variable Number of Repeats Tandem) de unidades repetitivas interceptadas de micobactérias (MIRUs- Mycobacterial Interspersed Repetitive Units), tem se mostrado alternativas úteis para análises de isolados de *M. tuberculosis* geneticamente relacionados (Frothingham *et al.* 1998; Mazars *et al.* 2001; Supply *et al.* 2000), especialmente em casos em que a análise utilizando IS6110-RFLP não é aplicável ou quando os resultados desta análise são de difícil interpretação (Shamputa *et al.* 2004). Nos casos de infecção simultânea por duas ou mais linhagens de *M. tuberculosis* são necessárias várias técnicas de DNA *fingerprint* (Shamputa *et al.* 2004).

No caso do complexo *M. tuberculosis*, os métodos de tipagem molecular são aplicáveis na diferenciação dos seus membros (Tsukamura 1983), que apesar de demonstrarem diferenças fenotípicas, possuem um alto grau de identidade genética (Domenech *et al.* 2001). Os genomas destas espécies são ricos em DNA repetitivo, (Cole *et al.* 1998) um fato que tem sido explorado pela tipagem molecular. Os conhecimentos adquiridos destas análises permitiram a discriminação e a determinação de traços clínicos relevantes, e forneceram dados como patogenicidade, adaptação ao hospedeiro e a origem das formas patogênicas (Reid *et al.* 2001).

Nesta revisão, procuramos ressaltar as principais técnicas moleculares utilizadas para genotipagem de micobactérias, evidenciando suas vantagens, desvantagens e limitações. Descreveremos as técnicas baseadas na análise de polimorfismo do DNA após digestão por enzima de restrição (RFLP), RFLP seguido de hibridização com sondas (IS6110, elemento repetitivo rico em GC), *spoligotyping* e MIRU-VNTR.

2.3.1- Métodos Baseados na análise de polimorfismo do DNA através de fragmentos de restrição

2.3.1.1- Polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP):

A diferenciação de linhagens do complexo *M. tuberculosis* usando tecnologia baseada em ácidos nucléicos se fundamenta em diferenças específicas de linhagens e frequências de certas seqüências de DNA em seu genoma. Neste método, o DNA é clivado com enzimas de restrição apropriadas (*PvuII*, por exemplo), resultando em fragmentos de restrição de DNA que são separados por eletroforese em gel de agarose (Collins *et al.* 1984; Patel *et al.* 1996).

Apesar de esta técnica ser rápida, a interpretação dos resultados do RFLP é difícil devido ao grande número de fragmentos gerados resultando em padrões complexos de difícil diferenciação e baixo poder discriminatório (Kanduma *et al.* 2003).

2.3.1.2- RFLP seguido de hibridização com sonda IS6110:

O RFLP seguido de hibridização se baseia na presença de elementos transponíveis (seqüências de inserção) no genoma do *M. tuberculosis* (van Embden *et al.* 1993) ou seqüências repetitivas do genoma, que podem ser evidenciadas após o emprego de endonucleases de restrição. Os elementos repetitivos de DNA são clonados e usados como sondas para visualizar somente os fragmentos de restrição que contenham a seqüência complementar para a sonda (Takahashi 2003). Os principais marcadores que são utilizados como sondas atualmente incluem o elemento de inserção (IS) 6110 e as seqüências repetitivas ricas em GC. Van Soolingen *et al.* (1991) demonstraram que IS são estáveis em *M. tuberculosis* mesmo após várias passagens *in vitro*.

O IS6110 é uma seqüência de inserção de 1361 pares de base (pb) que foi detectada em membros do complexo *M. tuberculosis* e tem se mostrado bastante conservada entre os diferentes isolados. O número de cópias de IS6110 presentes no genoma é espécie e linhagem dependentes (Kanduma *et al.* 2003) e portanto o IS6110 RFLP é amplamente aplicado na diferenciação de isolados (Niemann *et al.* 2000). As transposições do elemento de inserção

IS6110 são a maior fonte de variações no genoma do bacilo da tuberculose (Warren *et al.* 2000).

Ela se mostra uma técnica de fácil comparação, porque, geralmente apresenta bandas hibridizadas com igual intensidade, diferentemente de outras técnicas como o spoligotyping (Kremer *et al.* 1999). Devido a sua utilização mundial, os dados obtidos em qualquer laboratório podem ser comparados, facilitando o entendimento das cadeias de transmissão.

Além do número de cópias de IS6110 por linhagem variar em número, de zero a 25 cópias, a posição destes elementos no genoma também é variável, ampliando, desta forma, a possibilidade de gerar maior quantidade de padrões de bandas com os fragmentos resultantes após o tratamento com a enzima de restrição: *PvuII*. Os fragmentos de restrição são separados em gel de agarose, e posteriormente transferidos para uma membrana de nylon ou nitrocelulose. A visualização dos fragmentos contendo IS6110 se dá através de sondas complementares ao IS6110 marcadas que são adicionadas para a hibridização com os fragmentos transferidos para a membrana. Os fragmentos de restrição hibridizados podem ser visualizados por uma reação de quimioluminescência ou por radioatividade dependendo do tipo de marcação da sonda (van Embden *et al.* 1993).

As maiores desvantagens desta técnica abrangem a exigência de cultura de várias semanas e com organismos viáveis, para obtenção de DNA em quantidade e de alta qualidade, além do alto custo da técnica. Adicionalmente, algumas regiões, como Londres, apresentam grande número de linhagens com baixo número de cópias de IS6110 (25% do total de linhagens com menos de 5 cópias). As posições das bandas nestas cepas apresentam menor polimorfismo e portanto baixo poder discriminatório (Bauer *et al.* 1999; Maguire *et al.* 2002; Santos *et al.* 2007).

Uma importante implicação de DNA *fingerprint* RFLP-IS6110 para tuberculose é sua habilidade em mensurar diversidade de linhagens de *M. tuberculosis*, incluindo diferenças por região, população e possivelmente prevalência de linhagens endêmicas (McNabb *et al.* 2002). Esta diversidade foi demonstrada nos EUA por análises de genotipagem em bases de dados, em que 10883 pacientes tuberculosos, representaram aproximadamente 11,6% de

todos os casos novos daquele país de 1996 a 2000, resultando em 6128 amostras distintas (Lok *et al.* 2002).

2.3.1.3- Polimorfismo de seqüências repetitivas ricas em GC (PGRS):

As seqüências ricas em GC é o elemento repetitivo mais abundante presente no complexo *M. tuberculosis* (De Wit *et al.* 1990). Ele consiste de várias repetições em tandem de um consenso de seqüências de 96pb ricas em GC. Elementos PGRS estão presentes em 26 regiões do cromossomo do *M. tuberculosis* (Poulet *et al.* 1995) e também têm sido detectados em micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*.

O PGRS, primeiramente descrito por Ross e colaboradores (Ross *et al.* 1992), é uma técnica de hibridização que utiliza como sonda específica PGRS, um plasmídeo recombinante, o pTBN12, que contém seqüências consenso, contendo rico conteúdo GC (Yang *et al.* 1996). Quando o pTBN12 é usado sobre o DNA micobacteriano digerido com a enzima de restrição *AluI* ele detecta seqüências PGRS em *M. tuberculosis*, sendo um método secundário, em casos de ausência ou baixo número de cópias IS6110 em que esta tem seu poder discriminatório diminuído (Gillespie *et al.* 2000; Ross *et al.* 1992; Yang *et al.* 1996). Contudo, os padrões de bandas hibridizadas gerados pelo PGRS são frequentemente complexos para análises e padronização computacional (Ross *et al.* 1992).

2.3.2- Métodos baseados na análise de polimorfismo através da amplificação de DNA por reação da polimerase em cadeia (PCR)

Técnicas de tipagem mais rápidas têm sido desenvolvidas e a maioria delas são baseadas na amplificação baseada no método de PCR. Estes métodos tem sido vantajosos para tipificar *M. tuberculosis* diretamente em amostras clínicas dispensando a etapa de crescimento do microrganismo. Elas podem ser usadas para isolados não viáveis ou quando os isolados não podem ser reativados de coleções. Algumas destas técnicas, contudo, carecem de reprodutibilidade ou tem menor poder discriminatório que o RFLP-IS6110 (Kremer *et al.* 1999). Existem vários métodos baseados na tipagem molecular

utilizando-se PCR, dentre eles, a tipagem de espaços entre oligonucleotídeos (spoligotyping) e número variável de repetições em tandem (VNTR) se mostram os mais promissores.

2.3.2.1- *Spoligotyping*:

O método *spoligotyping* tem se tornado uma importante ferramenta para acompanhar linhagens com diferentes aplicações epidemiológicas (Warren *et al.* 2002). Devido à sua simplicidade o spoligotyping é um método de tipagem do complexo *M. tuberculosis* freqüentemente utilizada. Ele é usado como um método de tipagem adicional para linhagens com menos que cinco cópias de IS6110 (Bauer *et al.* 1999; Goguet de la Salmoniere *et al.* 1997; Suffys *et al.* 2000).

Esta técnica baseia-se no polimorfismo de DNA na região do locus de repetição direta (DR) de *M. tuberculosis*. Este locus contém DRs de 36pb interceptadas com espaços de seqüências não repetitivas de 34-41pb múltiplas e bem conservadas. Estas regiões foram descritas pela primeira vez flanqueando uma seqüência IS6110 (Mendiola *et al.* 1992).

As linhagens contém uma distinta região cromossomal que consiste de múltiplas repetições diretas (DR) de 36pb interceptadas por espaços únicos de seqüências de DNA (35-41pb) (Mathema *et al.* 2006) que variam em números de DRs e presença ou ausência de espaços particulares (Kamerbeek *et al.* 1997). É baseada na detecção de 43 espaços de seqüências interceptadas na região genômica DR de linhagens do complexo *M. tuberculosis* (Mathema *et al.* 2006; van Embden *et al.* 2000), envolvendo a amplificação destas regiões espaçadoras entre os DRs para posterior hibridização em uma membrana contendo os 43 oligonucleotídeos sintéticos correspondentes para as diferentes seqüências espaçadoras, ligados covalentemente. O resultado é obtido através da hibridização positiva ou não de cada seqüência espaçadora resultando em um padrão de hibridização que é comparado entre as diferentes amostras (Goyal *et al.* 1997).

O polimorfismo é proporcionado por estes espaços, os quais são variáveis em comprimento (de 34 a 41), seqüência e número (van Soolingen *et al.* 1991). Embora estes espaços variem, cada um é comum para um grupo de

linhagens (Goguet de la Salmoniere *et al.* 1997). Este polimorfismo é provavelmente duplo para recombinações homólogas entre DRs vizinhas ou distantes e para rearranjos dirigidos para o elemento de inserção IS6110, o qual está presente na região DR de muitas linhagens de *M. tuberculosis*. Visto que regiões DRs são bem conservadas dentre as linhagens de *M. tuberculosis*, cada cópia DR dentro do locus DR é um potente alvo para a amplificação por PCR (Kamerbeek *et al.* 1997).

Os resultados são altamente reprodutíveis, e os dados gerados indicando presença ou ausência, podem ser facilmente interpretados e computadorizados, e podem ser utilizados para comparações dentro dos laboratórios (Brudey *et al.* 2006). Quando usado em associação com outras técnicas alternativas ao RFLP-IS6110, o *spoligotyping* se mostra uma técnica rápida, efetiva e barata (Brudey *et al.* 2006; Lindstedt 2005). Entretanto, a utilização do *spoligotyping* em substituição da técnica do RFLP-IS6110 deve ser considerada com precaução (Wilson *et al.* 1998). Uma proporção de linhagens com diferenças no perfil do marcador genético RFLP-IS6110 exibem perfis idênticos de *spoligotyping* (Diaz *et al.* 1998). Entretanto, estudos realizados por Goguet de la Salmoniere e colaboradores (1997), demonstraram que o *spoligotyping* é um método adequado para triagens iniciais, porque consiste em uma técnica de PCR que requer pouca quantidade de DNA. Isolados do complexo *M. tuberculosis* que apresentam diferentes perfis de *spoligotyping*, também revelarão, sem exceção, diferentes RFLPs IS6110.

2.3.2.2- Número variável de repetições em tandem (VNTR):

Loci genéticos contendo VNTR formam a base do mapeamento genético humano. Muitos genes de importância humana têm sido identificados para um mapeamento baseados em suas ligações no locus VNTR. Este método, também é aplicado em forense humana e testes de paternidade (Andersen *et al.* 1996; Frenay *et al.* 1994; Frothingham 1995; Goyal *et al.* 1994).

Loci de repetição em tandem, similares aos minisatélites em eucariotos, também tem sido identificados em bactérias do complexo *M. tuberculosis*. Estes VNTRs freqüentemente se diferem em número de cópias entre os

isolados (Frothingham & Meeker-O'Connell 1998). Estas estruturas consistem em seqüências repetitivas de 40-100pb, chamadas de MIRUs (Mycobacterial interspersed repetitive units) (Magdalena *et al.* 1998; Supply *et al.* 2000) encontradas dispersas em 41 localizações do cromossomo de *M. tuberculosis* H37RV; 20 destas localizações se mostram polimórficas em número de cópias de MIRU entre os isolados. Estes alvos oferecem um potencial para o desenvolvimento de um método com alta resolução, conveniência e grandes aplicações para tipagem molecular (Mazars *et al.* 2001).

Estudos realizados por Domenech e colaboradores (2001) localizaram VNTRs tanto em regiões codificantes, quanto em regiões intergênicas do *M. tuberculosis* H37RV. Todos os loci VNTR reportados presentes em regiões codificantes, tinham tamanhos repetidos os quais eram múltiplos de três nucleotídeos. Parece que, em algumas bactérias patogênicas, VNTRs em regiões codificantes proporcionam grandes variações em proteínas envolvidas na patogenicidade, as quais podem ajudar o patógeno a se adaptar melhor e evadir do sistema imunológico do hospedeiro.

A tipagem VNTR-MIRU é baseada em PCR, produzindo dados facilmente manejáveis para serem aplicados nos estudos de epidemiologia molecular global do complexo *M. tuberculosis* (Mazars *et al.* 2001). Para revelar o número de repetições em tandem, o PCR é realizado com oligonucleotídeos iniciadores destinados a amplificar o locus de repetição em tandem selecionado. A presença e o tamanho do produto de PCR são determinados por eletroforese em gel de agarose, sendo que uma reação de PCR e um gel são destinados para cada locus. Baseando-se no conhecimento do tamanho de diferentes repetições em tandem, o número de repetições é calculado de acordo com dados previamente publicados (Cowan *et al.* 2002). Esta tipagem tem se mostrado muito informativa, pois se baseia na repetição do número de cópias em loci específico.

O poder discriminatório das análises de VNTR-MIRU são frequentemente proporcionais ao número de loci avaliados; em geral quando somente 12 loci são usados, esta técnica tem um menor poder discriminatório que RFLP-IS6110 contendo alto número de cópias, porém mais discriminatório quando utilizado em linhagens com baixo número de cópias da seqüência de inserção IS6110. Quando mais que 12 loci são usados, ou a análise de VNTR-

MIRU é combinada com spoligotyping, o poder discriminatório se aproxima ao gerado pela análise do RFLP-IS6110 (Kremer *et al.* 2005; Lee *et al.* 2002). A identificação do loci VNTR-MIRU mostrou ser igualmente aplicável para tipagem de *M. bovis*, o qual tem demonstrado difícil tipagem pelos métodos existentes (Cousins *et al.* 1998; Skuce *et al.* 2001).

O *M. bovis* infecta humanos freqüentemente através do leite fresco de vacas e não usualmente de pessoa para pessoa. As infecções encontradas por este patógeno são geralmente em sítios extrapulmonares. O RFLP-IS6110 não é um método muito adequado para a investigação do *M. bovis*. Isto ocorre porque proporções significativas destas linhagens isoladas de humanos contém somente uma cópia do elemento IS6110, e este está em uma posição fixa do genoma (Cousins *et al.* 1999). O VNTR-MIRU quando comparado com RFLP-IS6110 e spoligotyping produz amostras mais distintas (Barlow *et al.* 2001; Cowan *et al.* 2002).

2.3.3- Análise comparativa das diferentes técnicas de tipagem molecular

Kremer e colaboradores (1999), compararam diferentes métodos de tipagem de *Mycobacterium tuberculosis*. Eles analisaram estes métodos de acordo com seus graus de reprodutibilidade, de diferenciação e a especificidade dos mesmos. Oito diferentes laboratórios especializados em vários métodos de tipagem analisaram, cegamente, 131 amostras de DNA por 12 métodos diferentes, incluindo todos os citados nesta revisão. Dentre estas amostras, 90 linhagens eram de *M. tuberculosis*, dentre as quais, 31 amostras estavam em duplicatas, e outras 10 micobactérias diferentes de *M. tuberculosis*.

A reprodutibilidade das técnicas foi analisada comparando as amostras em duplicata. Os resultados obtidos por RFLP-IS6110 foram 100% reprodutíveis. PGRS sozinho foi de difícil análise computacional, devido à alta densidade de bandas e a variabilidade nas intensidades destas. Contudo, PGRS nas amostras em duplicata foram interpretadas, visualmente, como idênticas em todos os casos. Das amostras analisadas por métodos baseados em PCR, a reprodutibilidade variou entre 6% a 97%. A tipagem realizada por VNTR, apresentou apenas um par de amostras em duplicata com discordância,

obtendo um grau de reprodutibilidade de 97%. Quando realizada por *spoligotyping*, as amostras apresentaram um grau de 94% (das 31 amostras, 29 foram idênticas) de identidade.

O RFLP-IS6110 obteve o maior grau de discriminação das 90 linhagens do complexo *M. tuberculosis* que foram analisadas, obtendo 84 tipos diferentes. Já a técnica baseada na seqüência repetitiva rica em GC (PGRS) demonstrou 70 tipos, *spoligotyping*, 61 tipos e VNTR, 56 diferentes linhagens.

Contudo, apesar de o RFLP-IS6110 ser altamente reprodutível e discriminatório eles são pouco úteis para tipar linhagens que contenham baixo número de cópias IS6110 (Bauer *et al.* 1999; Lee *et al.* 2002). Para a análise da especificidade dos métodos testados, foram utilizadas aquelas 10 linhagens de 5 espécies diferentes não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. Os métodos RFLP-IS6110 e *spoligotyping* não se mostraram úteis para tipar estas linhagens, sendo, portanto, específicas para *M. tuberculosis*.

Estes estudos reforçam o motivo no qual o RFLP seguido de hibridização IS6110 é a técnica padronizada para tipar linhagens do complexo *M. tuberculosis* mundialmente. Ela se mostra uma técnica de alta reprodutibilidade, sensibilidade, além de ser muito específica. Tais vantagens podem ser perdidas quando se trata de linhagens com baixo número de cópias, contudo, tem-se nestes casos, a alternativa da utilização de uma outra técnica, também eficiente, como *spoligotyping* e VNTR, por exemplo.

2.3.4- Comparação de tipagens por RFLP-IS6110

DNA *fingerprint* de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* de populações selecionadas de várias regiões geográficas tem sido usadas para descrever o avanço da transmissão de certas linhagens com propriedades particulares, como uma maior virulência e resistência a drogas. A escolha de uma técnica padrão mundial, RFLP-IS6110, e a existência de um banco de dados, possibilitou a comparação de resultados obtidos em diferentes estudos (van Embden *et al.* 1993).

Estudos recentes contendo dados de pacientes residentes em países em desenvolvimento demonstram que uma avaliação local, tanto com características epidemiológicas quanto genóticas, são necessárias,

principalmente nestas áreas (Dale *et al.* 1999; Fandinho *et al.* 2000; Suffys *et al.* 2000). No Brasil, estudos sobre a epidemiologia molecular da tuberculose são escassos.

Uma considerável variabilidade e a presença de linhagens com baixo número de cópias de IS6110 (0 a 5 cópias) tem sido descritos em estudos prévios em diversos países, inclusive no Brasil (Dale *et al.* 1999; Durmaz *et al.* 2003; Fandinho *et al.* 2000; Ferrazoli *et al.* 2000; Pineda-Garcia *et al.* 1997; Suffys *et al.* 2000). Adicionalmente, investigações em diferentes partes do mundo apresentaram uma frequência de “clusters” em torno de 31 a 48% (Das *et al.* 2005; Ferdinand *et al.* 2003; Oelemann *et al.* 2007; Wilkinson *et al.* 1997) e isolados apresentando em média 8 a 10 cópias de IS6110 (Safi *et al.* 1997; Suffys *et al.* 2000; Torrea *et al.* 1996; Yuen *et al.* 1993).

Suffys e colaboradores (2000) analisaram isolados de diversas regiões do Brasil por RFLP-IS6110, e demonstraram diferenças regionais no agrupamentos destas linhagens. Eles ainda afirmam que o grande número de linhagens, caracterizadas por RFLP-IS6110, do Brasil quando comparadas com outros países, sugere que a transmissão global da tuberculose está ocorrendo com uma frequência maior que a esperada, ou que a estabilidade de certas linhagens com alto número de cópias de IS6110 é maior que a pressuposta.

O avanço do conhecimento da biologia molecular do *M. tuberculosis* tem mostrado ser bastante útil no entendimento da epidemiologia da tuberculose (Van Soolingen 2001). Nos anos 90, linhagens de *M. tuberculosis* multi-droga resistentes caracterizadas por RFLP-IS6110, foram associadas com severos surtos nosocomiais e com altas taxas de mortalidade na cidade de Nova York (Bifani *et al.* 1996). Na China, foi caracterizada a predominância de um grupo de isolados de *M. tuberculosis* com alto número de cópias de IS6110, as quais foram nomeadas linhagens Beijing (van Soolingen *et al.* 1995). Estudos posteriores identificaram que as linhagens encontradas em ambas as localidades eram geneticamente relacionadas, e atualmente são referidas como linhagens W-Beijing (Bifani *et al.* 2002; Glynn *et al.* 2002)

Recentemente, um grupo de isolados clínicos, linhagens da família Beijing, tem merecido considerável atenção. Estas linhagens têm sido mostradas com alta prevalência no continente asiático, bem como em países do Leste Europeu, e geralmente estão associadas a surtos nosocomiais e

comunitários, transmissões globais e resistência a drogas, sendo consideradas linhagens de alta virulência (Bifani *et al.* 2002; Glynn *et al.* 2002; Kurepina *et al.* 2005).

Estudos têm estimado que a disseminação clonal do ancestral comum de linhagens da família Beijing tenha ocorrido há menos de um século. Estas linhagens tiveram alguma vantagem seletiva na região de Beijing, resultando em uma agressiva expansão clonal que se espalhou para países vizinhos e outros continentes. As forças naturais que contribuem para a seleção e disseminação de linhagens dessa família são desconhecidas, contudo, um fator comum de todos os países do sudeste da Ásia, em que estas linhagens são epidêmicas, é a vacinação com a BCG. Estudos sugerem que linhagens da Família Beijing são mais prevalentes entre indivíduos vacinados com a BCG que entre os não vacinados em uma população na qual uma significativa fração não tem sido coberta com vacinação (van Soolingen *et al.* 1995).

Adicionalmente à família Beijing, linhagens da família Haarlem de distribuição global também vêm sendo associadas a resistência a drogas e relevante virulência (Mardassi *et al.* 2005). Estudos realizados em crianças com tuberculose no sul da África por Marais e colaboradores (2006) demonstraram uma alta prevalência de linhagens da família Beijing e Haarlem em criança com tuberculose resistente a drogas, tal fato reforça a contribuição destas linhagens na transmissão comunitária de resistência a drogas e a importância destas, na emergência de epidemias com linhagens de *M. tuberculosis* resistentes.

2.3.5- Justificativa

A tuberculose é uma doença reemergente, e as cepas da atualidade vêm desenvolvendo resistência às drogas destinadas ao tratamento. Desse modo, uma avaliação molecular das cepas se mostra de suma importância visto que permite uma futura caracterização dos genes responsáveis pela virulência bem como resistência a antibióticos podendo proporcionar dados que contribuirão para um progresso no tratamento e cura da tuberculose.

A técnica do RFLP é uma técnica padronizada mundialmente a fim de se poder comparar resultados de diferentes laboratórios. Poucos estudos a

respeito da caracterização genética de linhagens de *M. tuberculosis* no Brasil têm sido feitos, em Goiás este foi o primeiro. Dessa forma, com a análise do perfil obtido em nossos estudos poderemos nos certificar das cepas prevalente no estado, bem como identificar novos isolados do *M. tuberculosis* ou nos orientar a respeito de qual é a região geográfica de origem do isolado. Tal fato alertaria para providencias governamentais no sentido de controle de migração e imigração em áreas endêmicas.

Sabe-se que infecções por diferentes linhagens podem apresentar cursos diferentes de infecção, resposta imune do hospedeiro, bem como virulência. A caracterização genética de linhagens de *M. tuberculosis* se mostra de relevante importância, visto que podemos relacionar linhagem/virulência a fim de se obter um tratamento mais específico para cada tipo de linhagem e dessa forma otimizar a cura da doença, tornando-a mais rápida e eficaz.

Objetivos

3. Objetivos:

3.1- Objetivo Geral

- Estimar a diversidade genética de *M. tuberculosis*, pela técnica do RFLP-IS6110, isolados de pacientes atendidos em dois serviços de referência da cidade de Goiânia-Goiás.

3.2- Objetivos específicos

- Determinar o perfil de RFLP dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos em dois serviços de referência de Goiânia, Goiás
- Agrupar os isolados em um dendograma de acordo com a similaridade entre as amostras baseadas em seus respectivos perfis de DNA obtidas pela técnica do RFLP
- Identificar relações epidemiológicas entre os pacientes com *M. tuberculosis* agrupados em um mesmo cluster
- Comparar as linhagens encontradas no estudo com linhagens descritas como multi-droga-resistentes na literatura

Material e métodos

4. Materiais e Métodos:

A lista de reagente e soluções e seus respectivos cálculos encontram-se no apêndice.

4.1- Seleção das amostras:

Foram colhidas 175 amostras de escarro, no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad-HDT e no Centro de Referência e Apoio Diagnóstico de Goiânia, de acordo com suspeita clínica de tuberculose, no período de janeiro de 2006 a junho de 2007. Não houve discriminação quanto a raça, o sexo nem idade dos pacientes, sendo que todos que aceitaram participar do estudo assinando os documentos de consentimento livre e esclarecido foram incluídos. As coletas foram feitas de acordo com as normas de conduta da ética médica, nos quais estavam explícitos os procedimentos e objetivos do projeto e destino do material, bem como um questionário da história epidemiológica de cada paciente. O referido termo de consentimento foi aprovado pelo comitê de ética da UFG (anexo I).

4.2- Baciloscopia

A baciloscopia foi feita através da coloração específica para visualização de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR, técnica de Ziehl-Neelsen), e contagem de bastonetes avermelhados por campo. O resultado foi padronizado em número de cruces de acordo com as normas do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde 1994). Todas amostras que apresentaram baciloscopia positiva foram encaminhadas para o LACEN para posterior semeadura em meio de cultura apropriado e testes de identificação de espécie.

4.3- Cultura

Os espécimes, encaminhados ao LACEN foram processados para cultura após descontaminação prévia pela técnica de Petroff e em seguida

semeados em tubos de ensaio contendo meio de cultura sólido Lowestein-Jensen (L-J) adicionados de ovo, glicerol e asparagina. O crescimento foi acompanhado por um período de até 6 semanas em estufa a 37°C (Ministério da Saúde 1994).

4.4- Identificação da espécie

A identificação do *Mycobacterium tuberculosis* baseou-se no tempo de crescimento, sendo o *M. tuberculosis* uma bactéria de crescimento lento, sendo acompanhado até a 6ª semana de incubação, e na caracterização de colônias de cor creme, rugosas presentes na superfície do meio sem alterar sua cor. Bem como na realização de testes de inibição de crescimento pelo ácido p-nitrobenzóico (PNB-500µg/ml) em que apenas as micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* são sensíveis e pela hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH-2µg/ml) que apenas o *M. tuberculosis* do complexo *M. tuberculosis* é resistente (Ministério da Saúde 1994).

4.5- Extração do DNA das amostras de *M. tuberculosis* adaptado de Van Soolingen e colaboradores (1994):

Os isolados de *M. tuberculosis* identificados pelos métodos bioquímicos foram processadas para a extração de DNA cromossomal. As culturas em meio L-J foram aquecidas a 80°C por 20 minutos para a inativação das micobactérias por questões de biossegurança ainda no LACEN-Goiás e então transportadas para o laboratório de Bacteriologia Molecular do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. O equivalente a duas alçadas de cada cultura foram resuspendidas em 400 µL de tampão TE por agitação. À suspensão foram adicionadas 50µl de lizozima e incubadas por 1 hora a 37°C. Ao sistema de digestão 70µL de SDS a 10% e 6 µL de proteinase K foram adicionados, e o sistema foi incubado a 56°C por 10 minutos. Após incubação, 100µL de NaCl a 5M foram adicionados seguidos de 80 µL de solução CTAB/NaCl, agitado até se tornar leitosa e então incubadas por mais 10 minutos a 65°C.

Adicionou-se um volume igual de clorofil seguido de agitação por 30 segundos e centrifugação por 5 minutos a 12,000Xg. O sobrenadante foi precipitado através da adição de 0,6 volumes de isopropanol e incubado a uma temperatura de -20°C por 30 minutos. O ácido nucléico foi coletado por centrifugação a 12,000Xg por 20 minutos, lavado com 1 mL de etanol a 70% gelado. Após secagem, o DNA foi ressuspendido em 50uL de tampão TE. Os DNAs extraídos foram armazenados em freezer -20°C (van Soolingen *et al.* 1994).

4.6- Clonagem da seqüência de inserção IS6110

A partir de DNA cromossomal da cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv realizou-se a amplificação por PCR da região interna do elemento de inserção IS6110 utilizando-se primers, apresentados no quadro 1, descrito por Van Embden e colaboradores 1993. O produto de PCR foi então purificado em gel de agarose e clonado no plasmídeo pGemT easy (Promega). A confirmação da clonagem foi feita pela seleção de colônias de *E. Coli* DH5α brancas no meio LB contendo IPTG e X-Gal. O plasmídeo pGemT-IS6110 recombinante foi extraído das colônias prováveis e após preparações plasmidiais os mesmos foram submetidos à análise de perfil de digestão enzimática com a enzima *EcoRI* para confirmação da presença do inserto IS6110. O inserto obtido é homólogo a região direita das seqüências de inserção IS6110 de *M. tuberculosis* após clivagem com a endonuclease de restrição *PvuII* (van Soolingen *et al.* 1994).

Quadro 1- Primers utilizados pra amplificação da região interna do elemento de inserção IS6110

	Seqüências dos primers
INS-1	5`-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3´
INS-2	5`-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3´

4.7- Preparação das amostras de DNA e transferência

Duas microgramas do DNA micobacteriano foram digeridos com 10 Unidades da enzima de restrição *PvuII* no tampão apropriado, em um volume de 20 μ L, por 3 horas a 37°C. À mistura da digestão foram adicionados 2 μ l de tampão de amostra 5X. A mistura foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 1,0%, sem brometo de etídeo, em tampão TBE 1X e submetido a uma corrente elétrica de 40mV por cerca de 5 horas. Colocou-se o DNA da cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv para uma normalização das posições das bandas do gel, bem como um controle positivo para validar a sonda usada.

O gel foi desnaturado com tampão de desnaturação por 25 minutos sob agitação a temperatura ambiente, e então lavada com água bidestilada. Posteriormente foi neutralizado com tampão de neutralização por 30 minutos nas mesmas condições da desnaturação.

Após preparação do gel de agarose, realizou-se a transferência do DNA contido no gel para a membrana de nylon por capilaridade durante a noite. Após a transferência do material para a membrana, esta foi submetida ao crosslink em luz ultravioleta por 20 segundos para fixação do DNA.

4.8- Marcação da sonda

A sonda de IS6110 foi preparada pela digestão enzimática do plasmídeo recombinante pGemT-IS6110 com a enzima de restrição *EcoRI*. O fragmento liberado com a digestão correspondente à seqüência de inserção IS6110 foi purificado através de eluição em gel de agarose (Pure Link Quick Gel Extraction Kit- Invitrogen). A sonda de 243 pares de base foi então marcada através da técnica de “random priming” que resultou em uma sonda marcada com fluoresceína através de uma reação em que fluoresceína-11-dUTP (FI-dUTP) substitui parcialmente dTTP (Gene Images Random Prime Labeling Kit – Amersham-Biosciences).

4.9- Hibridização e detecção

As membranas foram incubadas com uma solução de pré-hibridização por 30 minutos a 60°C sob agitação lenta, no forno de hibridização. Foram então adicionados à solução de pré-hibridização 15 µl da sonda contendo 50ng de DNA marcado, ficando em contato com a membrana. Incubou-se durante a noite a 60°C, sob agitação lenta. Após incubação de hibridização as membranas foram lavadas 2 vezes nas soluções de lavagem 1 e 2 a 60°C por 15 minutos sob agitação lenta. Após as lavagens as membranas foram submetidas a solução de bloqueio diluída 5000 vezes em tampão A por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente e posteriormente, incubadas com solução contendo anti-fluoresceína-AP diluída 5000 vezes em 20ml de tampão A acrescido de 0,1g de soro fetal bovino, também por 1 hora sob agitação. As membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com tampão A acrescido de 0,3% de tween 20. Após as lavagens, as membranas foram colocadas em contato com o reagente de detecção por 5 minutos e posteriormente embrulhadas em papel filme para serem autoradiografadas dentro de um cassete usando-se um filme sensível (Hyperfilm, Amersham-Biosciences). Após exposição, que variou de 10 minutos a 1 hora, o filme foi revelado.

4.10- Análise dos perfis de RFLP e comparação com linhagens virulentas descritas na literatura

Os padrões de bandas obtidos do procedimento de hibridização foram analisados após digitalização das imagens. Para análise dos perfis de bandas e determinação de similaridades entre as amostras, bem como as linhagens da literatura, utilizou-se o programa BioNumerics versão 4.0 do Windows (Applied Maths). Com base nas análises computacionais utilizando coeficiente de similaridade de Dice e o algoritmo UPGMA (Unweiggheted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), com otimização e tolerância de posição de bandas de 1,5%, um dendograma foi construído e um estudo detalhado dos aspectos oriundos da anamnese clínica foi usado para se determinar possíveis conclusões de caracteres epidemiológicos. Foram classificados como *cluster*

aquelas linhagens que se agruparam com similaridade igual ou maior a 90%. Os *clusters* de RFLP-IS6110 indicados pelo programa foram visualmente verificados quanto a consistência.

4.11- Análise dos dados epidemiológicos

Os dados epidemiológicos obtidos dos pacientes na entrevista foram armazenados e analisados no programa EpiInfo 4.0 versão de fevereiro 2006.

Resultados

5.0. Resultados:

5.1- Análise dos dados epidemiológicos (EpiInfo)

Foram coletadas um total de 175 amostras com baciloscopia positiva com os respectivos termos de consentimento livre e esclarecido assinados. Destas amostras, 27 apresentaram cultura negativa para *M. tuberculosis* e 6 amostras foram identificadas como micobactérias atípicas, obtendo um total de 142 isolados de *M. tuberculosis* viáveis para a extração de DNA. Destas, 126 apresentaram um perfil de RFLP adequado para análises de similaridade. As demais amostras ou não apresentaram nenhuma banda ou apresentaram bandas incertas as quais os perfis de RFLP-IS6110 não ficaram de fácil interpretação e análise de comparação.

As frequências dos principais dados epidemiológicos coletados estão representadas na tabela 1. Verificou-se uma maior prevalência de tuberculose em indivíduos do sexo masculino (78,2%) economicamente ativos, com uma média de idade de 40 anos.

Dentre os entrevistados, 70,4% tinham alguma predisposição a doença, como um histórico de tuberculose prévia, más condições de vida, o uso de drogas imunossupressoras, doenças concomitantes, uso de cigarro, drogas ou bebidas alcoólicas, sendo que dentre estas, aproximadamente 13,% tinham diagnóstico positivo confirmado para HIV. Dentre os pacientes, 22 (14,6%) eram recidivos de tuberculose, destes, 11 não haviam concluído o tratamento anterior e dois eram conhecidamente multi-resistentes a drogas, diagnosticados por teste de sensibilidade requerido pelo médico responsável, os demais, provavelmente, haviam sido curados anteriormente, se tratando, provavelmente, de um nova infecção.

Tabela 1- Características epidemiológicas dos 142 pacientes com cultura positiva para *M. tuberculosis*

Sexo	Frequência	%
Feminino	31	21,8%
Masculino	111	78,2%
Raça		
Branca	68	47,9%
Negra	33	23,2%
Parda	41	28,9%
Predisposição		
Sim	100	70,4%
Não	42	29,6%
HIV		
Nao	100	70,4%
Nao sabe	24	16,9%
Sim	18	12,7%
BCG		
Nao	12	8,5%
Nao sabe	46	32,4%
Sim	84	59,1%

Os pacientes entrevistados eram de diversas regiões do estado, e ainda, alguns eram oriundos de outros estados, das regiões Norte, Nordeste e Sudeste, como mostrado na figura 1.

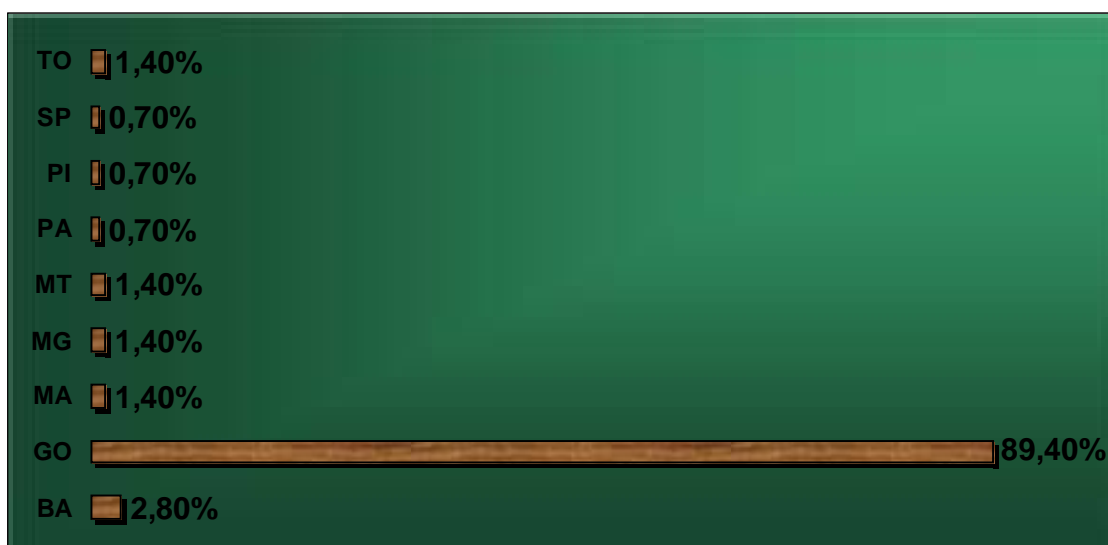


Figura 1- Gráfico representativo dos estados de origem dos pacientes positivos para *Mycobacterium tuberculosis*

5.2-PCR da região interna do elemento de inserção IS6110:

A partir de DNA cromossomal da cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv realizou-se a amplificação por PCR da região interna do elemento de inserção IS6110. O produto de PCR foi confirmado em gel de agarose e purificado para a clonagem no plasmídeo pGemT easy (Promega). (figura 2).

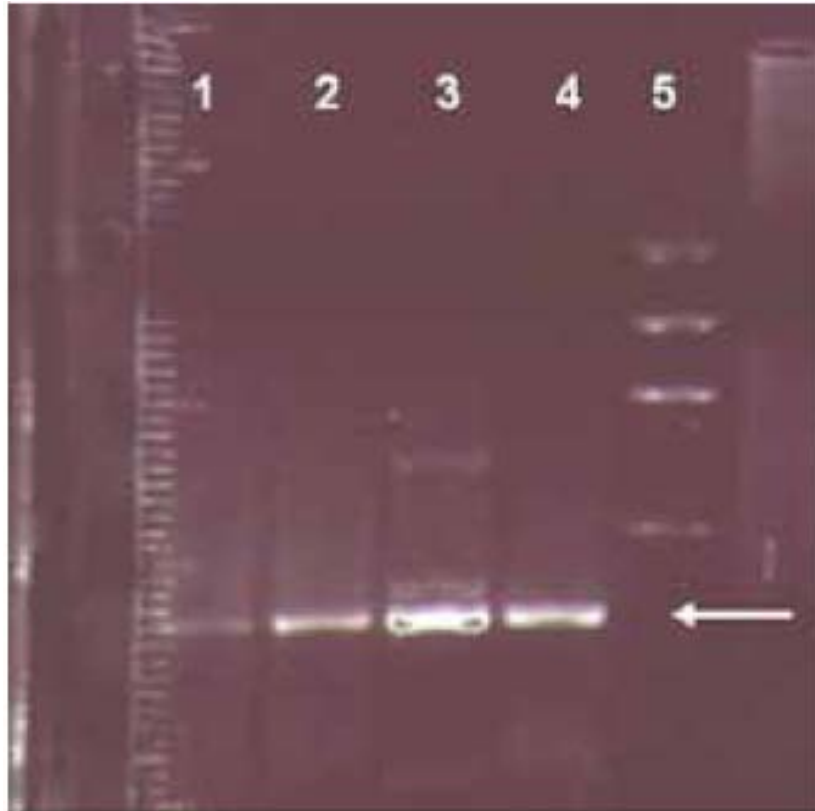


Figura2- Gel de agarose do produto da amplificação da seqüência de inserção IS6110. Raias 1 a 4 produtos de PCR em diferentes concentrações de magnésio, seta representando a banda esperada com 243pb. Raia 5- Marcador *Low DNA mass ladder*

5.3- Clonagem do fragmento de inserção IS6110 no plasmideo pGemT-Easy:

A partir do produto de amplificação da seqüência de inserção IS6110 montou-se um sistema de ligação com o vetor pGemT easy e o sistema foi utilizado para transformar por eletroporação células de *E. coli* DH5 α . Para facilitar a visualização dos clones recombinantes o sistema foi plaqueado em meio de cultura contendo o antibiótico de seleção ampicilina e substrato cromogênico X-gal. Algumas colônias recombinantes que se apresentaram lactose negativa e consequentemente a cor branca foram inoculadas em meio LB líquido adicionado de ampicilina e posteriormente tiveram seus plasmídeos extraídos e digeridos com a enzima *EcoRI* para confirmação da clonagem do fragmento de inserção IS6110 mostrados na figura 3

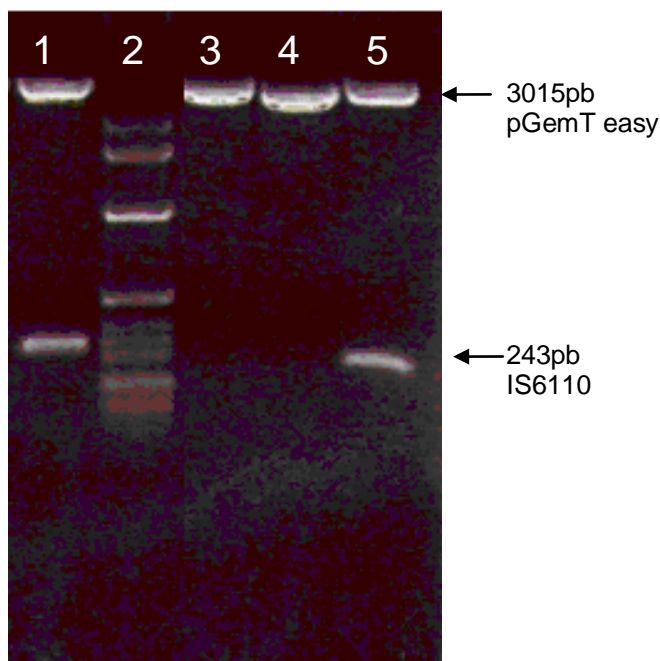


Figura 3- Gel de agarose da clonagem do fragmento de inserção IS6110 no plasmídeo pGemT- easy. Raias 1 e 5- pGemT-easy com o inserto IS6110 digerido com a enzima de restrição EcoRI; Raias 3 e 4- pGemT-easy sem o inserto; Raia 2- marcador 1KB ladder

5.4- Extração de DNA das amostras coletadas:

O DNA de cento e quarenta e duas amostras de cultura foi extraído e submetido à eletroforese em gel de agarose para a confirmação da presença e visualização da quantidade do DNA cromossomal de *M. tuberculosis*.

5.5- Perfil de RFLP das amostras

Obtivemos um total de 142 amostras de DNA que foram submetidas a técnica de *southern blotting* para obtenção de seus perfis de bandas de RFLP. Destas, 126 amostras apresentaram um perfil de RFLP-IS6110 adequado para as análises de similaridade e foram consideradas como o grupo de estudo. Utilizou-se o *M. tuberculosis* H37Rv como cepa padrão e controle positivo em todas as análises realizadas a fim de se normalizar a separação eletroforética dos géis de agarose, bem como a confirmação da atividade da sonda IS6110 utilizada como mostrados na figura 4.

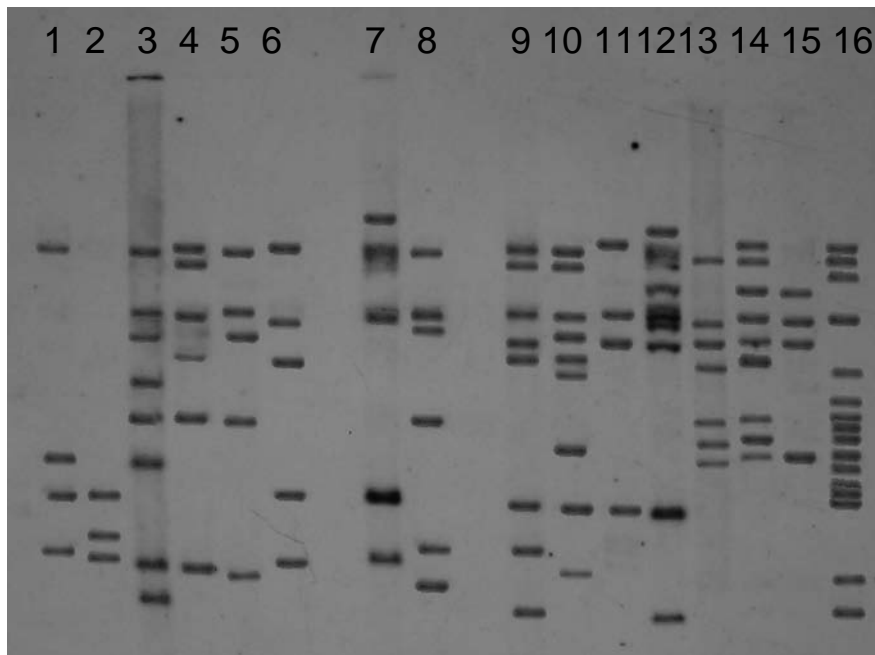


Figura 4- Imagem de uma auto-radiografia contendo o RFLP-IS6110 de 15 amostras de *Mycobacterium tuberculosis*. Raias 1 a 15- Perfis de RFLP de 15 amostras extraídas de *M. tuberculosis*. Raia 16- Cepa padrão H37Rv

5.6- Análise do padrão de bandas dos perfis de RFLP-IS6110

A fim de se obter o grau de similaridade das amostras estudadas através dos padrões de bandas obtidos nos RFLPs-IS6110 utilizou-se o programa Bionumerics versão 4.0 do Windows (Applied Maths). Foram consideradas *clusters*, amostras que obtiveram similaridade igual ou maior que 90%. O dendograma gerado está representado na figura 5.

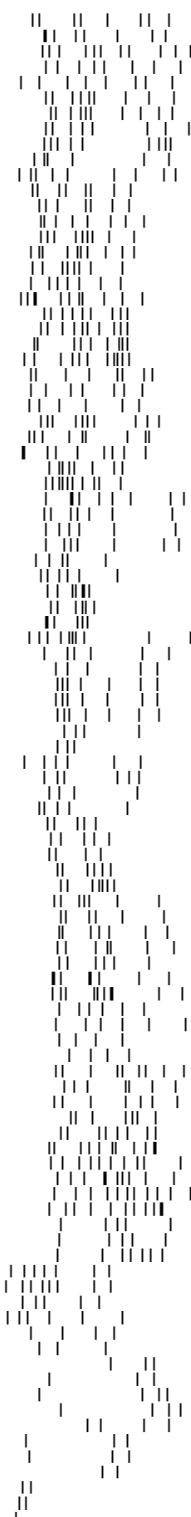
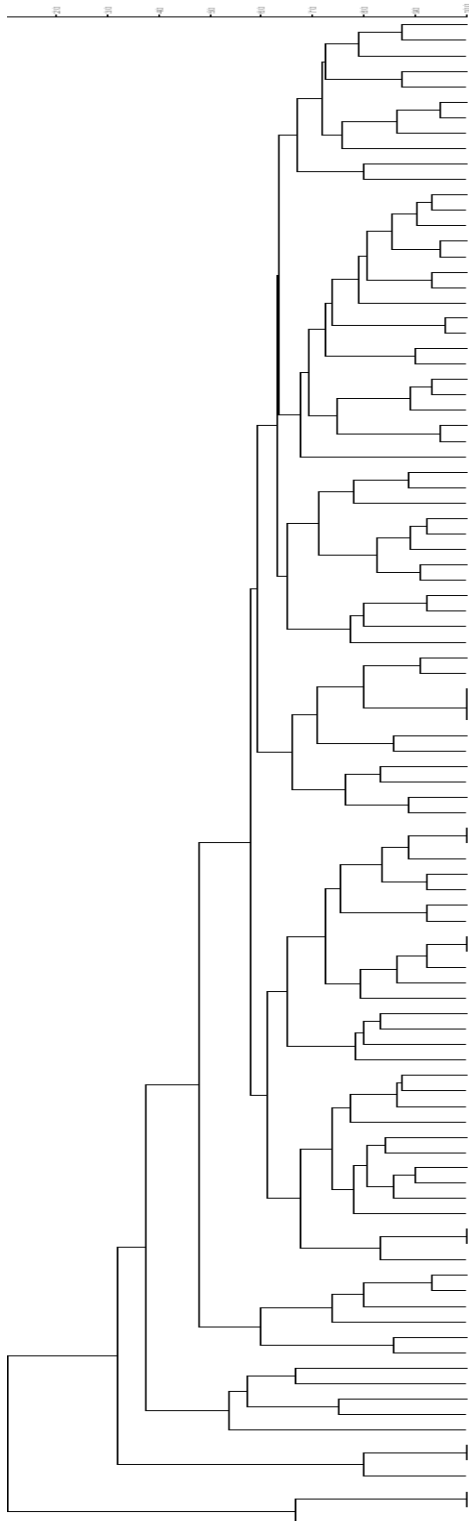
I

II

III

Clonagem (C) 1-100% (E) 1-10% (F) 1-10% (G) 1-10% (H) 1-10% (I) 1-10% (J) 1-10% (K) 1-10% (L) 1-10% (M) 1-10% (N) 1-10% (O) 1-10% (P) 1-10% (Q) 1-10% (R) 1-10% (S) 1-10% (T) 1-10% (U) 1-10% (V) 1-10% (W) 1-10% (X) 1-10% (Y) 1-10% (Z) 1-10% (AA) 1-10% (AB) 1-10% (AC) 1-10% (AD) 1-10% (AE) 1-10% (AF) 1-10% (AG) 1-10% (AH) 1-10% (AI) 1-10% (AJ) 1-10% (AK) 1-10% (AL) 1-10% (AM) 1-10% (AN) 1-10% (AO) 1-10% (AP) 1-10% (AQ) 1-10% (AR) 1-10% (AS) 1-10% (AT) 1-10% (AU) 1-10% (AV) 1-10% (AW) 1-10% (AX) 1-10% (AY) 1-10% (AZ) 1-10% (BA) 1-10% (BB) 1-10% (BC) 1-10% (BD) 1-10% (BE) 1-10% (BF) 1-10% (BG) 1-10% (BH) 1-10% (BI) 1-10% (BJ) 1-10% (BK) 1-10% (BL) 1-10% (BM) 1-10% (BN) 1-10% (BO) 1-10% (BP) 1-10% (BQ) 1-10% (BR) 1-10% (BS) 1-10% (BT) 1-10% (BU) 1-10% (BV) 1-10% (BW) 1-10% (BX) 1-10% (BY) 1-10% (BZ) 1-10% (CA) 1-10% (CB) 1-10% (CC) 1-10% (CD) 1-10% (CE) 1-10% (CF) 1-10% (CG) 1-10% (CH) 1-10% (CI) 1-10% (CJ) 1-10% (CK) 1-10% (CL) 1-10% (CM) 1-10% (CN) 1-10% (CO) 1-10% (CP) 1-10% (CQ) 1-10% (CR) 1-10% (CS) 1-10% (CT) 1-10% (CU) 1-10% (CV) 1-10% (CW) 1-10% (CX) 1-10% (CY) 1-10% (CZ) 1-10% (DA) 1-10% (DB) 1-10% (DC) 1-10% (DD) 1-10% (DE) 1-10% (DF) 1-10% (DG) 1-10% (DH) 1-10% (DI) 1-10% (DJ) 1-10% (DK) 1-10% (DL) 1-10% (DM) 1-10% (DN) 1-10% (DO) 1-10% (DP) 1-10% (DQ) 1-10% (DR) 1-10% (DS) 1-10% (DT) 1-10% (DU) 1-10% (DV) 1-10% (DW) 1-10% (DX) 1-10% (DY) 1-10% (DZ) 1-10% (EA) 1-10% (EB) 1-10% (EC) 1-10% (ED) 1-10% (EE) 1-10% (EF) 1-10% (EG) 1-10% (EH) 1-10% (EI) 1-10% (EJ) 1-10% (EK) 1-10% (EL) 1-10% (EM) 1-10% (EN) 1-10% (EO) 1-10% (EP) 1-10% (EQ) 1-10% (ER) 1-10% (ES) 1-10% (ET) 1-10% (EU) 1-10% (EV) 1-10% (EW) 1-10% (EX) 1-10% (EY) 1-10% (EZ) 1-10% (FA) 1-10% (FB) 1-10% (FC) 1-10% (FD) 1-10% (FE) 1-10% (FF) 1-10% (FG) 1-10% (FH) 1-10% (FI) 1-10% (FJ) 1-10% (FK) 1-10% (FL) 1-10% (FM) 1-10% (FN) 1-10% (FO) 1-10% (FP) 1-10% (FQ) 1-10% (FR) 1-10% (FS) 1-10% (FT) 1-10% (FU) 1-10% (FV) 1-10% (FW) 1-10% (FX) 1-10% (FY) 1-10% (FZ) 1-10% (GA) 1-10% (GB) 1-10% (GC) 1-10% (GD) 1-10% (GE) 1-10% (GF) 1-10% (GG) 1-10% (GH) 1-10% (GI) 1-10% (GJ) 1-10% (GK) 1-10% (GL) 1-10% (GM) 1-10% (GN) 1-10% (GO) 1-10% (GP) 1-10% (GQ) 1-10% (GR) 1-10% (GS) 1-10% (GT) 1-10% (GU) 1-10% (GV) 1-10% (GW) 1-10% (GX) 1-10% (GY) 1-10% (GZ) 1-10% (HA) 1-10% (HB) 1-10% (HC) 1-10% (HD) 1-10% (HE) 1-10% (HF) 1-10% (HG) 1-10% (HH) 1-10% (HI) 1-10% (HJ) 1-10% (HK) 1-10% (HL) 1-10% (HM) 1-10% (HN) 1-10% (HO) 1-10% (HP) 1-10% (HQ) 1-10% (HR) 1-10% (HS) 1-10% (HT) 1-10% (HU) 1-10% (HV) 1-10% (HW) 1-10% (HX) 1-10% (HY) 1-10% (HZ) 1-10% (IA) 1-10% (IB) 1-10% (IC) 1-10% (ID) 1-10% (IE) 1-10% (IF) 1-10% (IG) 1-10% (IH) 1-10% (II) 1-10% (IJ) 1-10% (IK) 1-10% (IL) 1-10% (IM) 1-10% (IN) 1-10% (IO) 1-10% (IP) 1-10% (IQ) 1-10% (IR) 1-10% (IS) 1-10% (IT) 1-10% (IU) 1-10% (IV) 1-10% (IW) 1-10% (IX) 1-10% (IY) 1-10% (IZ) 1-10% (JA) 1-10% (JB) 1-10% (JC) 1-10% (JD) 1-10% (JE) 1-10% (JF) 1-10% (JG) 1-10% (JH) 1-10% (JI) 1-10% (JJ) 1-10% (JK) 1-10% (JL) 1-10% (JM) 1-10% (JN) 1-10% (JO) 1-10% (JP) 1-10% (JQ) 1-10% (JR) 1-10% (JS) 1-10% (JT) 1-10% (JU) 1-10% (JV) 1-10% (JW) 1-10% (JX) 1-10% (JY) 1-10% (JZ) 1-10% (KA) 1-10% (KB) 1-10% (KC) 1-10% (KD) 1-10% (KE) 1-10% (KF) 1-10% (KG) 1-10% (KH) 1-10% (KI) 1-10% (KJ) 1-10% (KL) 1-10% (KM) 1-10% (KN) 1-10% (KO) 1-10% (KP) 1-10% (KQ) 1-10% (KR) 1-10% (KS) 1-10% (KT) 1-10% (KU) 1-10% (KV) 1-10% (KW) 1-10% (KX) 1-10% (KY) 1-10% (KZ) 1-10% (LA) 1-10% (LB) 1-10% (LC) 1-10% (LD) 1-10% (LE) 1-10% (LF) 1-10% (LG) 1-10% (LH) 1-10% (LI) 1-10% (LJ) 1-10% (LK) 1-10% (LL) 1-10% (LM) 1-10% (LN) 1-10% (LO) 1-10% (LP) 1-10% (LQ) 1-10% (LR) 1-10% (LS) 1-10% (LT) 1-10% (LU) 1-10% (LV) 1-10% (LW) 1-10% (LX) 1-10% (LY) 1-10% (LZ) 1-10% (MA) 1-10% (MB) 1-10% (MC) 1-10% (MD) 1-10% (ME) 1-10% (MF) 1-10% (MG) 1-10% (MH) 1-10% (MI) 1-10% (MJ) 1-10% (MK) 1-10% (ML) 1-10% (MN) 1-10% (MO) 1-10% (MP) 1-10% (MQ) 1-10% (MR) 1-10% (MS) 1-10% (MT) 1-10% (MU) 1-10% (MV) 1-10% (MW) 1-10% (MX) 1-10% (MY) 1-10% (MZ) 1-10% (NA) 1-10% (NB) 1-10% (NC) 1-10% (ND) 1-10% (NE) 1-10% (NF) 1-10% (NG) 1-10% (NH) 1-10% (NI) 1-10% (NJ) 1-10% (NK) 1-10% (NL) 1-10% (NM) 1-10% (NN) 1-10% (NO) 1-10% (NP) 1-10% (NQ) 1-10% (NR) 1-10% (NS) 1-10% (NT) 1-10% (NU) 1-10% (NV) 1-10% (NW) 1-10% (NX) 1-10% (NY) 1-10% (NZ) 1-10% (OA) 1-10% (OB) 1-10% (OC) 1-10% (OD) 1-10% (OE) 1-10% (OF) 1-10% (OG) 1-10% (OH) 1-10% (OI) 1-10% (OJ) 1-10% (OK) 1-10% (OL) 1-10% (OM) 1-10% (ON) 1-10% (OO) 1-10% (OP) 1-10% (OQ) 1-10% (OR) 1-10% (OS) 1-10% (OT) 1-10% (OU) 1-10% (OV) 1-10% (OW) 1-10% (OX) 1-10% (OY) 1-10% (OZ) 1-10% (PA) 1-10% (PB) 1-10% (PC) 1-10% (PD) 1-10% (PE) 1-10% (PF) 1-10% (PG) 1-10% (PH) 1-10% (PI) 1-10% (PJ) 1-10% (PK) 1-10% (PL) 1-10% (PM) 1-10% (PN) 1-10% (PO) 1-10% (PP) 1-10% (PQ) 1-10% (PR) 1-10% (PS) 1-10% (PT) 1-10% (PU) 1-10% (PV) 1-10% (PW) 1-10% (PX) 1-10% (PY) 1-10% (PZ) 1-10% (QA) 1-10% (QB) 1-10% (QC) 1-10% (QD) 1-10% (QE) 1-10% (QF) 1-10% (QG) 1-10% (QH) 1-10% (QI) 1-10% (QJ) 1-10% (QK) 1-10% (QL) 1-10% (QM) 1-10% (QN) 1-10% (QO) 1-10% (QP) 1-10% (QQ) 1-10% (QR) 1-10% (QS) 1-10% (QT) 1-10% (QU) 1-10% (QV) 1-10% (QW) 1-10% (QX) 1-10% (QY) 1-10% (QZ) 1-10% (RA) 1-10% (RB) 1-10% (RC) 1-10% (RD) 1-10% (RE) 1-10% (RF) 1-10% (RG) 1-10% (RH) 1-10% (RI) 1-10% (RJ) 1-10% (RK) 1-10% (RL) 1-10% (RM) 1-10% (RN) 1-10% (RO) 1-10% (RP) 1-10% (RQ) 1-10% (RR) 1-10% (RS) 1-10% (RT) 1-10% (RU) 1-10% (RV) 1-10% (RW) 1-10% (RX) 1-10% (RY) 1-10% (RZ) 1-10% (SA) 1-10% (SB) 1-10% (SC) 1-10% (SD) 1-10% (SE) 1-10% (SF) 1-10% (SG) 1-10% (SH) 1-10% (SI) 1-10% (SJ) 1-10% (SK) 1-10% (SL) 1-10% (SM) 1-10% (SN) 1-10% (SO) 1-10% (SP) 1-10% (SQ) 1-10% (SR) 1-10% (SS) 1-10% (ST) 1-10% (SU) 1-10% (SV) 1-10% (SW) 1-10% (SX) 1-10% (SY) 1-10% (SZ) 1-10% (TA) 1-10% (TB) 1-10% (TC) 1-10% (TD) 1-10% (TE) 1-10% (TF) 1-10% (TG) 1-10% (TH) 1-10% (TI) 1-10% (TJ) 1-10% (TK) 1-10% (TL) 1-10% (TM) 1-10% (TN) 1-10% (TO) 1-10% (TP) 1-10% (TQ) 1-10% (TR) 1-10% (TS) 1-10% (TT) 1-10% (TU) 1-10% (TV) 1-10% (TW) 1-10% (TX) 1-10% (TY) 1-10% (TZ) 1-10% (UA) 1-10% (UB) 1-10% (UC) 1-10% (UD) 1-10% (UE) 1-10% (UF) 1-10% (UG) 1-10% (UH) 1-10% (UI) 1-10% (UJ) 1-10% (UK) 1-10% (UL) 1-10% (UM) 1-10% (UN) 1-10% (UO) 1-10% (UP) 1-10% (UQ) 1-10% (UR) 1-10% (US) 1-10% (UT) 1-10% (UU) 1-10% (UV) 1-10% (UW) 1-10% (UX) 1-10% (UY) 1-10% (UZ) 1-10% (VA) 1-10% (VB) 1-10% (VC) 1-10% (VD) 1-10% (VE) 1-10% (VF) 1-10% (VG) 1-10% (VH) 1-10% (VI) 1-10% (VJ) 1-10% (VK) 1-10% (VL) 1-10% (VM) 1-10% (VN) 1-10% (VO) 1-10% (VP) 1-10% (VQ) 1-10% (VR) 1-10% (VS) 1-10% (VT) 1-10% (VU) 1-10% (VV) 1-10% (VW) 1-10% (VX) 1-10% (VY) 1-10% (VZ) 1-10% (WA) 1-10% (WB) 1-10% (WC) 1-10% (WD) 1-10% (WE) 1-10% (WF) 1-10% (WG) 1-10% (WH) 1-10% (WI) 1-10% (WJ) 1-10% (WK) 1-10% (WL) 1-10% (WM) 1-10% (WN) 1-10% (WO) 1-10% (WP) 1-10% (WQ) 1-10% (WR) 1-10% (WS) 1-10% (WT) 1-10% (WU) 1-10% (WV) 1-10% (WW) 1-10% (WX) 1-10% (WY) 1-10% (WZ) 1-10% (XA) 1-10% (XB) 1-10% (XC) 1-10% (XD) 1-10% (XE) 1-10% (XF) 1-10% (XG) 1-10% (XH) 1-10% (XI) 1-10% (XJ) 1-10% (XK) 1-10% (XL) 1-10% (XM) 1-10% (XN) 1-10% (XO) 1-10% (XP) 1-10% (XQ) 1-10% (XR) 1-10% (XS) 1-10% (XT) 1-10% (XU) 1-10% (XV) 1-10% (XW) 1-10% (XX) 1-10% (XY) 1-10% (XZ) 1-10% (YA) 1-10% (YB) 1-10% (YC) 1-10% (YD) 1-10% (YE) 1-10% (YF) 1-10% (YG) 1-10% (YH) 1-10% (YI) 1-10% (YJ) 1-10% (YK) 1-10% (YL) 1-10% (YM) 1-10% (YN) 1-10% (YO) 1-10% (YP) 1-10% (YQ) 1-10% (YR) 1-10% (YS) 1-10% (YT) 1-10% (YU) 1-10% (YV) 1-10% (YW) 1-10% (YX) 1-10% (YY) 1-10% (YZ) 1-10% (ZA) 1-10% (ZB) 1-10% (ZC) 1-10% (ZD) 1-10% (ZE) 1-10% (ZF) 1-10% (ZG) 1-10% (ZH) 1-10% (ZI) 1-10% (ZJ) 1-10% (ZK) 1-10% (ZL) 1-10% (ZM) 1-10% (ZN) 1-10% (ZO) 1-10% (ZP) 1-10% (ZQ) 1-10% (ZR) 1-10% (ZS) 1-10% (ZT) 1-10% (ZU) 1-10% (ZV) 1-10% (ZW) 1-10% (ZX) 1-10% (ZY) 1-10% (ZZ) 1-10%

Lorena



- 08
- 115
- 130
- 92
- 81
- 55
- 131
- 137
- 43
- 72
- 01
- 225
- 19
- 139
- 39
- 97
- 04
- 149
- 24
- 46
- 26
- 124
- 154
- 88
- 121
- 47
- 29
- 67
- 59
- 38
- 1335
- 62
- 102
- CR11
- 143
- 1364
- 107
- 120
- 106
- 122
- 178
- 84
- 64
- 153
- 71
- 37
- 60
- 10
- 125
- 11
- 132
- CR12
- 134
- 05
- 31
- 99
- 138
- 95
- 141
- 109
- 51
- 98
- 142
- 36
- CR17
- 123
- 66
- 45
- CR15
- 104
- 74
- 61
- 100
- 70
- 35
- 1752
- 91
- 25
- 76
- 27
- 118
- 34
- 03
- 33
- 89
- 90
- 16
- 58
- 146
- 150
- 40
- 49
- 22
- 28
- CR14
- 1365
- 151
- 147

Figura 5- Em I- dendograma obtido com a análise de similaridade das amostras através do perfil de bandas de RFLP-IS6110. Em II- perfil de bandas do RFLP-IS6110 das amostras. Em III- identificação das amostras. Legenda:A:amostras coletadas no HDT;CR:amostras coletadas no Centro de referencia

Analisando o dendograma representado na figura 5 nota-se que os perfis de RFLP-IS6110 analisados, permitiram o agrupamento de 43% das amostras com similaridade igual ou maior que 90% totalizando 24 *clusters*, como representados na figura 6.



Figura 6- Número de isolados de *M. tuberculosis* agrupados em um mesmo *cluster*

O número de cópias de IS6110 das amostras variou entre uma e quatorze cópias, sendo que a maioria das amostras tinham entre 6 e 9 cópias, como representado na figura 7

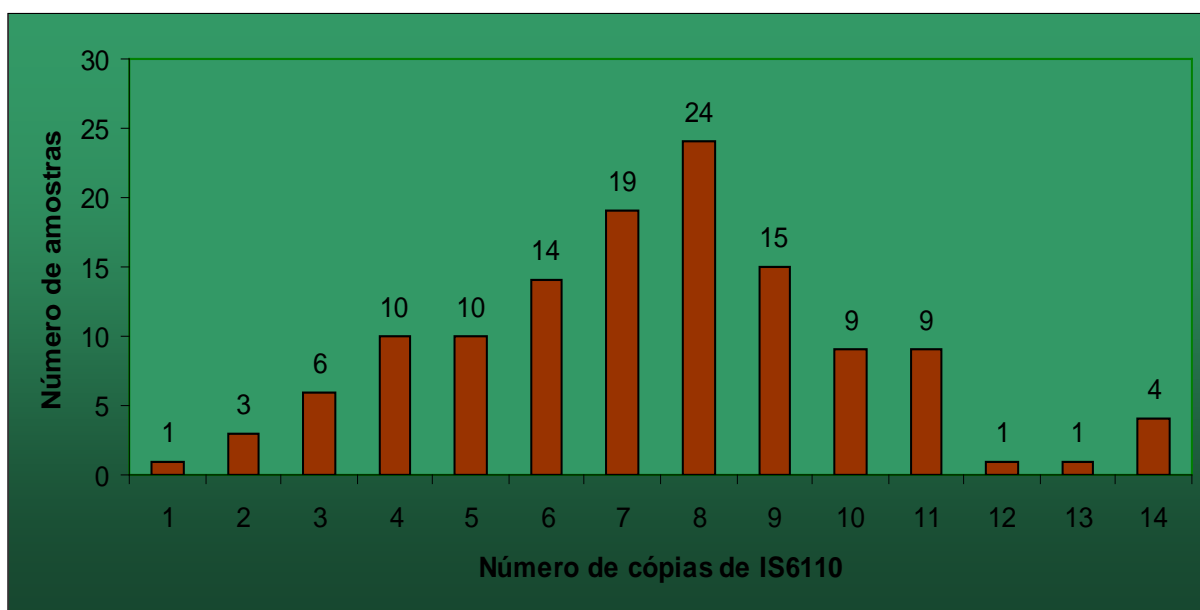


Figura 7- Frequência do número de cópias de IS6110 por linhagem de *M. tuberculosis*

5.7- Comparação dos perfis de RFLP-IS6110 com a literatura

A partir de linhagens descritas previamente na literatura (Cave *et al.* 2005; Kurepina *et al.* 2005; Segal 2000; Lopez *et al.* 2003), realizou-se a comparação dos perfis obtidos no estudo com linhagens consideradas virulentas, da Família W-Beijing e Haarlem. O dendograma gerado a partir destas comparações está representado na figura 8

Dentre as 126 amostras do estudo comparadas com as linhagens da literatura, três localizaram-se dentro do clado formado pelas linhagens virulentas da família Beijing e Haarlem como demonstrada na figura 9

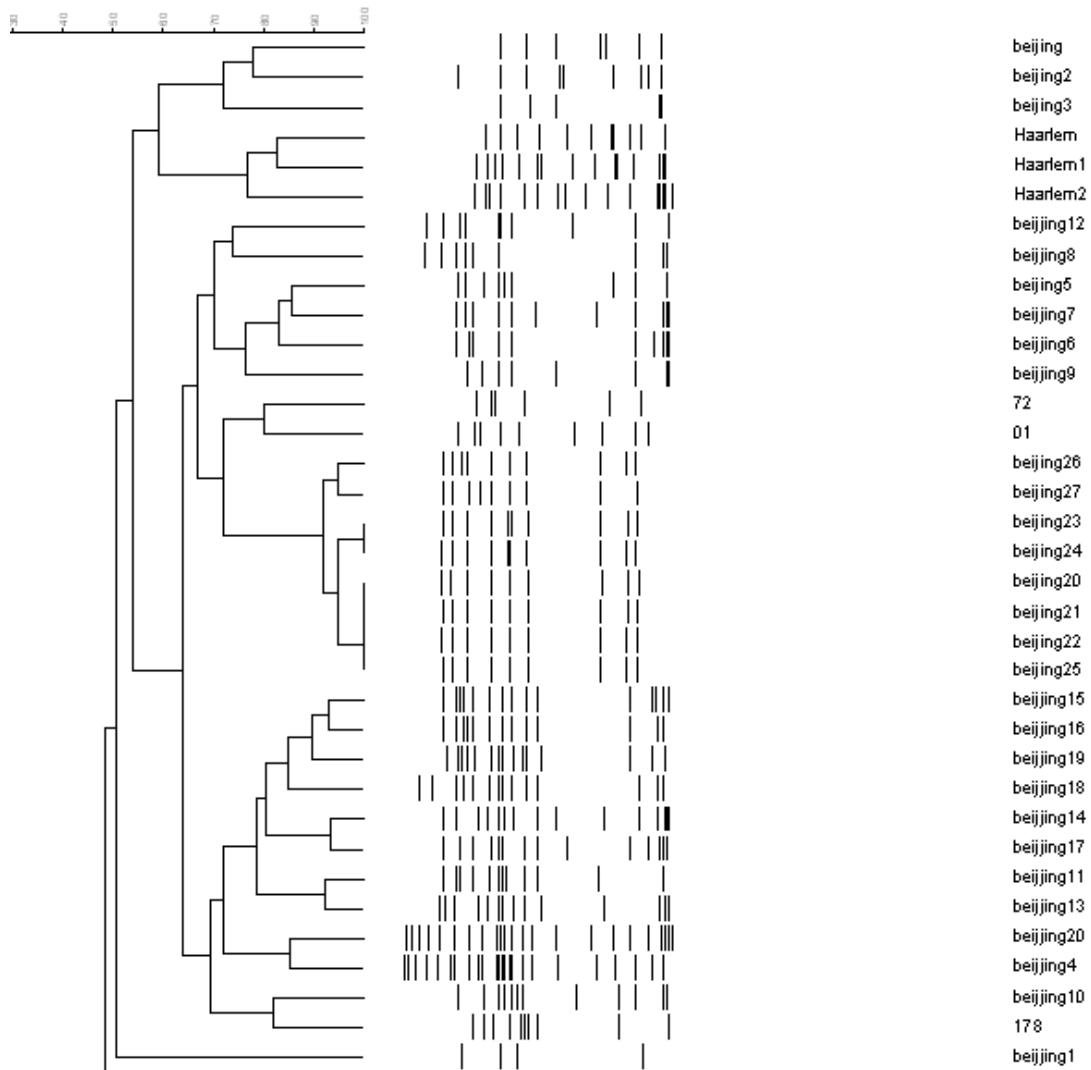


Figura 9- Parte do dendograma obtido com a comparação das amostras com linhagens da literatura demonstrando o Clado de linhagens MDR-TB

Discussão

6.0. Discussão:

DNA *fingerprint* de *Mycobacterium tuberculosis* baseada no marcador IS6110 tem demonstrado alta eficácia na detecção da origem de certas infecções bem como fornecido dados para uma adequação dos programas de controle da tuberculose (Asgharzadeh *et al.* 2006). Adicionalmente, a relação entre tipagem por RFLP e origem geográfica de linhagens de *M. tuberculosis*, além de freqüências de grupos (Torrea *et al.* 1996; van Soolingen *et al.* 1991) tem sido demonstrado por diversos países.

Poucos estudos a respeito da caracterização genética de linhagens de *M. tuberculosis* no Brasil têm sido feitos (Boffo 2004; Calusni *et al.* 2003; Oelemann *et al.* 2007; Suffys *et al.* 2000). Em Goiás este foi o primeiro e demonstrou que as linhagens possuem relevante similaridade, visto que há discretas variações genéticas entre elas.

Um total de trinta e três amostras foi desconsiderado do estudo visto que apresentaram como sendo micobactérias outras ao *M. tuberculosis* ou apresentaram cultura negativa. Seis dos isolados tiveram identificação de *Mycobacterium avium*, tal fato é de relevante importância visto que nos centros de saúde onde as amostras foram coletadas, a baciloscopia é o principal método de diagnóstico para tuberculose, diante disso a probabilidade de diagnósticos falsos positivos é relativamente grande, já que não temos uma identificação de espécie, podendo, desta forma, comprometer o tratamento do paciente. Adicionalmente, vinte e sete amostras de escarro com baciloscopia positiva, tiveram suas culturas negativas, após seis semanas de observação. Tal fato pode ser justificado pela presença de pacientes em fase final do tratamento em que ou a cultura demora um tempo maior para apresentar colônias visíveis, ou há inibição do crescimento de colônias.

A transposição das seqüências de inserção IS6110 é um processo tempo-dependente, e o grau de polimorfismo entre os descendentes de um clone particular em uma população é um reflexo do tempo decorrido desde sua divergência. Com isso, a análise da estrutura populacional por RFLP-IS6110 pode gerar informações sobre a história evolutiva e a disseminação de clones em particular em uma dada região geográfica (Van Soolingen *et al.* 1995).

Durante os últimos anos, *fingerprint* tem sido utilizado para definir fatores de risco de transmissão de tuberculose, e a hipótese que agrupamentos entre as amostras estão relacionados com transmissões recentes geralmente é aceita (Suffys *et al.* 2000). As amostras analisadas pelo RFLP-IS6110 permitiram o agrupamento de 43% das amostras em 24 *clusters*, dezoito eram de duas amostras, seis de três amostras, como mostrado na figura 6. A predominância de pequenos *clusters* neste estudo sugere que a transmissão da tuberculose nos pacientes atendidos na cidade de Goiânia se trata, possivelmente, de pequenos surtos envolvendo diferentes linhagens de *M. tuberculosis*. Contudo, provavelmente o verdadeiro montante de transmissões recentes de tuberculose na população estudada pode ter sido subestimado, primeiro porque o tempo de coleta foi relativamente curto para recrutar todos os possíveis casos de transmissões recentes, segundo porque não foram incluídos no estudo todos os casos de tuberculose notificados no período coletado.

A frequência de *cluster* observada é similar aos obtidos em estudos prévios em diferentes partes do mundo (Das *et al.* 2005; Ferdinand *et al.* 2003; Narayanan *et al.* 2002) bem como em estudos realizados em diferentes regiões do Brasil (Calusni *et al.* 2003; Oelemann *et al.* 2007). Tal fato, geralmente demonstra que essas linhagens tiveram um curto intervalo de tempo evolutivo e, portanto sugerem transmissões recentes entre os pacientes, visto que foram observadas poucas trocas genéticas.

A presença de linhagens com baixo número de cópias de IS6110 tem sido descritas em estudos prévios no Brasil, assim como em diversos outros países (Das *et al.* 2005; Ferdinand *et al.* 2003; Oelemann *et al.* 2007; Wilkinson *et al.* 1997). A quantidade de clusters, bem como a frequência de linhagens com baixo número de cópias mostram que a tipagem por RFLP-IS6110 pode ser usado no Brasil para monitorar cadeias de transmissão (Strassle *et al.* 1997; Suffys *et al.* 2000). Dentre as linhagens obtidas no estudo, o número de cópias variou entre uma e quatorze cópias de IS6110, como demonstradas na figura 7, sendo que 23,8% das amostras possuíam menos que cinco cópias.

Em um estudo sobre a transmissão da tuberculose em Paris, o sexo masculino foi considerado um fator de risco para tuberculose (Gutierrez *et al.* 1998). Oelemann e colaboradores (2007) em estudos recentes no Brasil, também obtiveram uma maior prevalência de tuberculose em indivíduos do

sexo masculino. O presente estudo, de acordo com a literatura, constatou uma maior prevalência da doença entre homens, como mostrado na tabela 1, contudo não podemos expandir tal afirmação para a população, visto que o fato, na região estudada, pode estar restrito apenas ao grupo analisado.

Adicionalmente, as cepas de *M. tuberculosis* isoladas do estado de Goiás que se apresentaram agrupadas em um mesmo cluster eram pertencentes a pacientes que aparentemente não apresentavam nenhuma relação específica, como grau de parentesco, infecção por HIV, proximidades em suas moradias entre outras, sugerindo que a transmissão da doença foi casual, ou seja, em locais públicos onde há um fluxo contínuo de pessoas. Diante disso, observa-se uma possível dificuldade nos programas de controle no estado, visto que os fatores chave para se prevenir a transmissão da tuberculose está no tratamento de casos ativos, bem como na investigação de contatos.

Chama-se ainda a atenção para os casos de recidivas de tuberculose encontrados na região em que 50% dos casos de recidiva observados, se tratavam de abandono de tratamento, apresentando, portanto, a necessidade de se fortalecer a prática da estratégia do tratamento por observação direta (DOTs), a fim de se evitar surgimentos de novos casos de multiresistência a drogas no estado de Goiás, visto que dois isolados de *M. tuberculosis* eram sabidamente resistentes.

Estudos têm demonstrado a relação entre a tipagem por RFLP e a origem geográfica de linhagens de *M. tuberculosis*, e que a frequência de formação de *clusters* é influenciada por diferenças nos programas de controle da tuberculose e na prevalência de linhagens em determinadas áreas (Chevrel-Dellagi *et al.* 1993).

Um estudo recente sobre a estrutura populacional de *M. tuberculosis* na Etiópia, Tunísia e Holanda sugeriram um maior polimorfismo de DNA na Etiópia que na Tunísia, embora a incidência de tuberculose naquela região seja em torno de cinco vezes a da Tunísia. Isso, provavelmente, se deve ao fato de que não existe um programa de vacinação eficaz na Etiópia, em contraste com a Tunísia, sendo que a vacinação pode estar favorecendo a seleção de linhagens de *M. tuberculosis* que resistem à imunidade induzida pela BCG (Hermans *et al.* 1995).

No Brasil, a vacinação com BCG foi introduzida em 1940 e sistematicamente usada em todas as crianças desde 1976, as quais podem estar atuando selecionando linhagens particulares de *M. tuberculosis* e resultando numa diminuição do polimorfismo devido à redução do número de linhagens possíveis de causar infecção no país (Suffys *et al.* 2000). Dentre os indivíduos estudados, a maioria, como mostrado na tabela 1, haviam sido imunizados com o Bacilo de Calmette-Guerin.

Dentre as amostras analisadas, quinze eram oriundas de outros estados do país, destas, oito obtiveram perfis de RFLP-IS6110 únicos, ou seja, não estavam relacionadas a algum *cluster*. Adicionalmente, uma das linhagens conhecidamente resistente era pertencente a um paciente residente de outro estado que não se agrupou em nenhum *cluster*. Tal fato pode sugerir a entrada de novas linhagens no estado, assim como a introdução de novas cepas resistentes na região. A imigração de indivíduos infectados de diferentes regiões, não só do Brasil como do mundo, podem se tornar uma grande ameaça para os programas de controle da tuberculose, visto que há a possibilidade de não se ter medidas de controle apropriadas para algumas linhagens em determinadas áreas.

A nível molecular, a epidemia global da tuberculose consiste de múltiplas subepidemias genotípicas-específicas. Frequentemente, a interação com o hospedeiro, bem como o ambiente são fatores importantes no sucesso de determinado genótipo em regiões geográficas específicas (Gagneux *et al.* 2006). Diferenças nas interações patológicas com hospedeiro de diferentes linhagens são bem relatadas em modelos animais, onde infecções com diferentes linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* provocam diferentes respostas imunológicas (Lopez *et al.* 2003).

Manca e colaboradores (2001) demonstraram que camundongos infectados com linhagens da família Beijing apresentavam uma carga bacilar dez vezes maior e uma baixa taxa de sobrevivência quando comparados aos infectados com outras linhagens. Nestas investigações notou-se que este fenômeno estava relacionado a uma fraca resposta imunológica do hospedeiro induzida pela linhagem infectante. Outros estudos apontam linhagens da família Haarlem associados a virulência e multiresistência a drogas, assim como as da família Beijing (Lopez *et al.* 2003).

Quando comparamos os perfis de *M. tuberculosis* isolados no presente estudo com linhagens previamente identificadas como virulentas (famílias Beijing e Haarlem), três amostras localizaram-se dentro do clado formado por estas linhagens virulentas, como visto na figura 9. Tal fato chama a atenção para a necessidade de se ter uma identificação rápida do tipo de linhagem a fim de se evitar surtos de linhagens altamente virulentas, bem como para a grande importância da adequação dos programas de controle da tuberculose quanto à prevalência de cada linhagem nas diferentes regiões. Entretanto um estudo mais aprofundado em relação aos dados clínicos e patológicos de tais pacientes se mostram necessários para se estabelecer a relação entre a linhagem e o perfil de RFLP-IS6110.

Conclusões

7.0. Conclusões:

Obtivemos um perfil adequado para análises de similaridade de RFLP-IS6110 de 126 amostras. Estes perfis originaram um agrupamento de 43% das amostras em algum *cluster*, contudo nenhuma relação epidemiológica aparente entre estes pacientes foi identificada.

A comparação das amostras estudadas com linhagens MDR demonstrou que três amostras possuem um perfil de RFLP-IS6110 semelhante à elas, contudo, estudos mais detalhados sobre dados clínicos e patológicos destes pacientes são necessários para se ter uma confirmação da presença de linhagens desta Família no estado.

A comparação das amostras coletadas na cidade de Goiânia não só com linhagens MDR, bem como diversas linhagens prevalentes no mundo depositadas em um banco de dados internacional, são perspectivas para os próximos trabalhos.

Referências Bibliográficas

8.0. Referências Bibliográficas:

Alland D, Kalkut GE, Moss AR *et al.* Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* 1994; 330 (24):1710-6.

Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J Bacteriol* 1996; 178 (2):377-84.

Andrews J, Basu S, Scales D *et al.* XDR-TB in South Africa: Theory and Practice. *PLoS Med* 2007; 4 (4):e163.

Anthony RM, Schuitema AR, Bergval IL *et al.* Acquisition of rifabutin resistance by a rifampicin resistant mutant of *Mycobacterium tuberculosis* involves an unusual spectrum of mutations and elevated frequency. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005; 4:9.

Aranaz A, Cousins D, Mateos A *et al.* Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53 (Pt 6):1785-9.

Arnold C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 (2):120-8.

Asgharzadeh M, Shahbadian K, Majidi J *et al.* IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East Azerbaijan Province of Iran. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 (5):517-21.

Baptista IM, Oelemann MC, Opromolla DV *et al.* Drug resistance and genotypes of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency virus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (8):1147-52.

Barlow RE, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH *et al.* Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (7):2453-7.

Bauer J, Andersen AB, Kremer K *et al.* Usefulness of spoligotyping To discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (8):2602-6.

Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE *et al.* Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 2002; 10 (1):45-52.

Bifani PJ, Plikaytis BB, Kapur V *et al.* Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *Jama* 1996; 275 (6):452-7.

Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 1992; 257 (5073):1055-64.

Boffo MMS, Mattos, I.G., Ribeiro, M.O. and Neto, I.C.O. Tuberculosis associated to AIDS: demographic, clinical and laboratory characteristics of patients cared for at reference center in the south of Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004; 30 (4):140-46.

Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 2006; 6:23.

Calusni AL, Roscani GN, Villares MC *et al.* IS6110 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Campinas, Brazil: evidence of intercontinental distribution of strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98 (5):655-8.

Carricajo A, Vincent V, Berthelot P *et al.* Mycobacterial cross-contamination of bronchoscope detected by molecular techniques. *J Hosp Infect* 1999; 42 (3):252-3.

Cave MD, Yang ZH, Stefanova R *et al.* Epidemiologic import of tuberculosis cases whose isolates have similar but not identical IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (3):1228-33.

Chaves F, Dronda F, Alonso-Sanz M *et al.* Evidence of exogenous reinfection and mixed infection with more than one strain of *Mycobacterium tuberculosis* among Spanish HIV-infected inmates. *Aids* 1999; 13 (5):615-20.

Chevrel-Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R *et al.* Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (9):2446-50.

Chimara E, Ferrazoli L, Leao SC. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using gyrB-restriction fragment length polymorphism analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (7):745-8.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393 (6685):537-44.

Collins DM, De Lisle GW. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol* 1984; 130 (4):1019-21.

Collins FM. Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2 (4):360-77.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A *et al.* Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53 (Pt 5):1305-14.

Cousins DV, Skuce RA, Kazwala RR *et al.* Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Tuberculosis in Animals Subsection. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2 (6):471-8.

Cousins DV, Williams SN, Dawson DJ. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: DNA typing of isolates, 1970-1994. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3 (8):722-31.

Cowan LS, Mosher L, Diem L *et al.* Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (5):1592-602.

Dale JW, Nor RM, Ramayah S *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (5):1265-8.

Das SD, Narayanan S, Hari L *et al.* Differentiation of highly prevalent IS6110 single-copy strains of *Mycobacterium tuberculosis* from a rural community in South India with an ongoing DOTS programme. *Infect Genet Evol* 2005; 5 (1):67-77.

De Wit D, Steyn L, Shoemaker S *et al.* Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (11):2437-41.

Diaz R, Kremer K, de Haas PE *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2 (9):743-50.

Domenech P, Barry CE, 3rd, Cole ST. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Curr Opin Microbiol* 2001; 4 (1):28-34.

Dormans J, Burger M, Aguilar D *et al.* Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol* 2004; 137 (3):460-8.

Durmaz R, Gunal S, Yang Z *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9 (8):873-7.

Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH *et al.* An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326 (23):1514-21.

Eisenstadt J, Hall GS. Microbiology and classification of mycobacteria. *Clin Dermatol* 1995; 13 (3):197-206.

Enarson DA, Chretien J. Epidemiology of respiratory infectious diseases. *Curr Opin Pulm Med* 1999; 5 (3):128-35.

Espinal MA. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis (Edinb)* 2003; 83 (1-3):44-51.

Fandinho FC, Kritski AL, Hofer C *et al.* RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94 (3):271-5.

Ferdinand S, Sola C, Verdol B *et al.* Molecular characterization and drug resistance patterns of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in an AIDS counseling center in Port-au-Prince, Haiti: a 1-year study. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (2):694-702.

Fernando SL, Britton WJ. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunol Cell Biol* 2006; 84 (2):125-37.

Ferrazoli L, Palaci M, Marques LR *et al.* Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4 (1):18-25.

Frenay HM, Theelen JP, Schouls LM *et al.* Discrimination of epidemic and non-epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (3):846-7.

Frothingham R. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (10):2801-2.

Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998; 144 (Pt 5):1189-96.

Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2869-2873

Geiter L. Ending Neglect: The Elimination of Tuberculosis in the United States. Washington: Committee on the Elimination of Tuberculosis in the United States, Division of Health Promotion and Disease Prevention, Institute of Medicine.

Gillespie SH, Dickens A, McHugh TD. False molecular clusters due to nonrandom association of IS6110 with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (6):2081-6.

Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ *et al.* Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (8):843-9.

Goguet de la Salmoniere YO, Li HM, Torrea G *et al.* Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (9):2210-4.

Goyal M, Saunders NA, van Embden JD et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (3):647-51.

Goyal M, Young D, Zhang Y et al. PCR amplification of variable sequence upstream of katG gene to subdivide strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (12):3070-1.

Grange JM. The biology of the genus *Mycobacterium*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1996; 25:1S-9S.

Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (2):486-92.

Hermans PWM, Messadi F, Guebrexabher H, van Soolingen D, de Haas PE, Heersma H, de Neeling H, Ayoub A, Portaels F, Frommel D et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* 1995; 171(6):1504-13

Hill AV. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:593-617.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (4):907-14.

Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J Appl Microbiol* 2003; 94 (5):781-91.

Kato-Maeda M, Bifani PJ, Kreiswirth BN *et al.* The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 2001; 107 (5):533-7.

Koneman EW AS, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. Diagnóstico Microbiológico-Texto e atlas colorido. 5ªed. Rio de Janeiro 903-950; 2001. Translation of: AE Cury.

Kremer K, Arnold C, Cataldi A *et al.* Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (11):5628-38.

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R *et al.* Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (8):2607-18.

Kurepina N, Likhoshvay E, Shashkina E *et al.* Targeted hybridization of IS6110 fingerprints identifies the W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains among clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (5):2148-54.

Lee AS, Tang LL, Lim IH *et al.* Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high-resolution minisatellite-based typing. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (2):657-9.

Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 2005; 26 (13):2567-82.

Lok KH, Benjamin WH, Jr., Kimerling ME *et al.* Molecular differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains without IS6110 insertions. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (11):1310-3.

Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitias C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernandez-Pando R, Huygen K, Van Soolingen D. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003;133:30-37

Magdalena J, Supply P, Locht C. Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (9):2471-6.

Maguire H, Dale JW, McHugh TD *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995-7 showing low rate of active transmission. *Thorax* 2002; 57 (7):617-22.

Manca C, Tsenova L, Bergtold A *et al.* Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (10):5752-7.

Marais BJ, Victor TC, Hesselning AC, Barnard M, Jordaan A, Brittle W, Beyers N, van Helden PD, Warren RM, Schaaf HS. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape province of South Africa. *Journal of Clinical Microbiology* .44(10):3539-3543

Mardassi H, Namouchi A, Haltiti R, Zarrouk M, Mhenni B, Karboul A, Khabouchi N, van Pittius NG, Streicher EM, Rauzier J, Gicquel B, Dellagi K. Tuberculosis due to resistant Haarlem strain, Tunisia. *Emerg. Infect. Dis.*; 11(6):957-961

Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19 (4):658-85.

Mazars E, Lesjean S, Banuls AL *et al.* High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (4):1901-6.

McNabb SJ, Braden CR, Navin TR. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: lessons learned and implications for the future. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (11):1314-9.

Mendiola MV, Martin C, Otal I *et al.* Analysis of the regions responsible for IS6110 RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Res Microbiol* 1992; 143 (8):767-72.

Miltgen J, Morillon M, Koeck JL *et al.* Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis subsp canetti*. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (11):1350-2.

Mims C, Playfair J, Roit I, Wakelin D, Willians R. *Microbiologia Médica*. 2º ed, Ed. Manole LTDA, São Paulo, 1999.

Ministério da Saúde-Secretaria de Vigilância em Saúde. http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=23497
14/08/2006.

Ministério da Saúde. Manual de bacteriologia da tuberculose. 1994:115.

Ministério da Saúde-Sistema de Vigilância epidemiológica. Relatório de situação Goiás- Série C. Projetos, Programas e Relatórios 2006 [cited 2007 19/06/2007].

Ministério da Saúde-II Consenso Brasileiro de Tuberculose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004; 30(supl 1):54-6.

Moro ML, Gori A, Errante I *et al.* An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis involving HIV-infected patients of two hospitals in Milan, Italy. Italian Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak Study Group. *Aids* 1998; 12 (9):1095-102.

Mostrom P, Gordon M, Sola C *et al.* Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8 (11):694-704.

Murray CJ, Styblo K, Rouillon A. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1990; 65 (1):6-24.

Narayanan S, Das S, Garg R *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in a rural area of high prevalence in South India: implications for disease control and prevention. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (12):4785-8.

Nardell EA. Tuberculosis in homeless, residential care facilities, prisons, nursing homes, and other close communities. *Semin Respir Infect* 1989; 4 (3):206-15.

Natal S, Valente JG, Sanchez AR *et al.* Isoniazid and rifampicin resistance and prior treatment for tuberculosis. *Cad Saude Publica* 2003; 19 (5):1277-81.

Niemann S, Richter E, Dalugge-Tamm H *et al.* Two cases of *Mycobacterium microti* derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. *Emerg Infect Dis* 2000; 6 (5):539-42.

Oelemann MC, Fontes AN, Pereira MA *et al.* Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Community Health Centers of Rio de Janeiro City, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 (4):455-62.

Organization WH. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva.2003

Patel S, Wall S, Saunders NA. Heminested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (7):1686-90.

Pfyffer GE, Brown-Elliott, B.A. and Wallace, R.J., Jr. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation, and staining procedures. In, translator and editor *Manual of clinical Microbiology*. 8^o edn; 2003; p. 532-59.

Pineda-Garcia L, Ferrera A, Hoffner SE. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Honduras. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (9):2393-7.

Poulet S, Cole ST. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Microbiol* 1995; 163 (2):87-95.

Prevention ATSatCfDCa. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 (4 Pt 1):1376-95.

Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A *et al.* Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol* 2004; 53 (Pt 2):107-13.

Reid SD, Hoe NP, Smoot LM *et al.* Group A *Streptococcus*: allelic variation, population genetics, and host-pathogen interactions. *J Clin Invest* 2001; 107 (4):393-9.

Rhee JT, Piatek AS, Small PM *et al.* Molecular epidemiologic evaluation of transmissibility and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (6):1764-70.

Rosenzweig DY. Nontuberculous mycobacterial disease in the immunocompetent adult. *Semin Respir Infect* 1996; 11 (4):252-61.

Ross BC, Raios K, Jackson K *et al.* Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (4):942-6.

Rossetti ML, Valim AR, Silva MS *et al.* Resistant tuberculosis: a molecular review. *Rev Saude Publica* 2002; 36 (4):525-32.

Safi H, Aznar J, Palomares JC. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3-year period (1993 to 1995) in Seville, Spain. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (10):2472-6.

Santos LC, Junquera-Kipnis A, Kipnis A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Revista de Patologia Tropical*. 2007; 36:1-15.

Schuster M. Mycobacterial disease: a historical and epidemiologic perspective. *Clin Dermatol* 1995; 13 (3):191.

Segal MR, H. Salamon and P. M. Small. Comparing DNA Fingerprint of Infectious Organisms. In: *Statistical Science*. Vol. 15, Series Comparing DNA Fingerprint of Infectious Organisms. 2000; p. 27-45.

Shamputa IC, Rigouts L, Eyongeta LA *et al.* Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (12):5528-36.

Skuce RA, Neill SD. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: exploiting molecular data. *Tuberculosis (Edinb)* 2001; 81 (1-2):169-75.

Strassle A, Putnik J, Weber R *et al.* Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in a human immunodeficiency virus cohort in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (2):374-8.

Suffys PN, Ivens de Araujo ME, Rossetti ML *et al.* Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res Microbiol* 2000; 151 (5):343-51.

Supply P, Mazars E, Lesjean S *et al.* Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 36 (3):762-71.

Takahashi M. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* using by RFLP analysis between genomic DNA--its accomplishment and practice. *Kekkaku* 2003; 78 (10):641-51.

Torrea G, Offredo C, Simonet M *et al.* Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (5):1043-9.

Tsukamura M. Numerical classification of 280 strains of slowly growing mycobacteria. Proposal of *Mycobacterium tuberculosis* series, *Mycobacterium avium* series, and *Mycobacterium nonchromogenicum* series. *Microbiol Immunol* 1983; 27 (4):315-34.

Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF *et al.* An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* 1998; 338 (10):633-9.

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (2):406-9.

van Embden JD, van Gorkom T, Kremer K *et al.* Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol* 2000; 182 (9):2393-401.

Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001; 249 (1):1-26.

van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW *et al.* DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* 1994; 235:196-205.

van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE *et al.* Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation

of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29 (11):2578-86.

van Soolingen D, Qian L, de Haas PE *et al.* Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (12):3234-8.

Warren RM, Sampson SL, Richardson M *et al.* Mapping of IS6110 flanking regions in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* demonstrates genome plasticity. *Mol Microbiol* 2000; 37 (6):1405-16.

Warren RM, Streicher EM, Charalambous S *et al.* Use of spoligotyping for accurate classification of recurrent tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (10):3851-3.

Wilkinson D, Pillay M, Crump J *et al.* Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in rural Africa. *Trop Med Int Health* 1997; 2 (8):747-53.

Wilson SM, Goss S, Drobniewski F. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a *Mycobacterium* reference unit. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (11):3385-8.

Yang Z, Chaves F, Barnes PF *et al.* Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (12):3044-8.

Yuen LK, Ross BC, Jackson KM *et al.* Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (6):1615-8.

Apéndice

9.0 Apêndice

Lista de reagentes e soluções utilizados nos experimentos

Baciloscopia

- Fucsina Fenicada a 0,3%

Fucsina básica	3g
Álcool etílico a 95% PA	100mL

- Azul de Metileno

Azul de metileno	1g
Álcool Etílico PA	100mL
Água Tipol	completar 1 litro de solução

- Solução descorante

Álcool Etílico	970mL
Ácido clorídrico	30mL

Descontaminação, cultura e identificação de *M. tuberculosis*

- NaOH 4%
- Meio comercial Lowenstein Jensen (L-J) acrescido de ovo, asparagina e glicerol
- Ácido p-nitrobenzóico 500 µg
- Ácido tiofeno-2-carboxílico 2 µg
- Água destilada tipol 1mL

Extração de DNA

- Tampão TE

Tris-HCl pH 7,5	10mM
EDTA	1mM

- Lisozima

Lisozima	20mg
Água MiliQ	1mL

- SDS 10%

Dodecil Sulfato de Sódio 10g
Água tipo I qsp

- Proteinase K

Proteinase K 20mg
Água MiliQ 1mL

- NaCl 5M

NaCl 292,20g
Água tipo I qsp 1 litro

- CTAB/NaCl

Brometo de Cetiltrimetilamônio 10%
NaCl 0,73M

- Clorofil

Clorofórmio 24/25 (v/v)
Álcool isoamílico 1/25 (v/v)
TE 10 % volume final

- Etanol 70%

Álcool etílico 70mL
Água tipo I qsp 30mL

Clonagem do fragmento de inserção

- Linhagens utilizadas

Mycobacterium tuberculosis H37Rv

Escherichia coli DH5 α

- Vetor para clonagem

Plasmídeo pGemT easy (Promega)

- Meio de cultura Lúria-Bertani (LB)

Peptona	10 g
Extrato de levedura	5g
NaCl	10g
Água destilada qsp	1 L

- X-gal

20mg do reagente em 1mL de dimetilformamida

- IPTG (Isopropil β D tiogalactopiranosídeo)

20mg do reagente em 1ml de água bidestilada (100mM)

Eletroforese em gel de agarose

- TBE 10 X (Tris-Borato e EDTA)

Tris-base	54g
Ácido bórico	27,5g
EDTA 0,5M (pH 8)	40 ml
Água Tipo I para completar	500 ml.

O TBE 10X era diluído para 1X acrescentando 90ml de água bidestilada em 10 ml de TBE10X

- Gel de agarose 1%

Agarose	3g
TBE 1X	300ml
Brometo de etídeo	5µl/100ml

Para o procedimento de transferência da técnica de Southern blotting o brometo de etídeo não era adicionado ao gel de agarose.

- Tampão de amostra TEB 5X

Tampão TBE 10X	50%
Glicerol	50%
Azul de bromofenol	0,01%
Xileno cianol	0,01%

Southern blotting

- Solução de Desnaturação

NaCl	1,5M
NaOH	0,5M

- Solução de Neutralização

NaCl	1,5M
Tris-HCl	0,5M (pH 7.5)

- SSC 20X

Citrato de Sódio	0,3M
NaCl	3M

- Solução de pré-hibridização

SSC	5X
SDS	0,1%
Sulfato de dextrano	5%
Solução de bloqueio	1/20

- Soluções de lavagem

Solução 1

SSC	1X
SDS	0,1%

Solução 2

SSC	0,5X
SDS.	0,1%

- Tampão A

Tris-HCl	100mM
NaCl	300mM

pH 9,5 autoclavada ou filtrada

Anexos