

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

Trabalho de Conclusão de Curso

“Identificação Molecular e Genotipagem pela técnica de *Spoligotyping* de *Mycobacterium tuberculosis* isolado da população indígena e não-indígena do Mato Grosso do Sul (MS).”

Leonardo Biancolino Marino

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Clarice Queico Fujimura Leite

ARARAQUARA – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

Trabalho de Conclusão de Curso

**“Identificação Molecular e Genotipagem pela técnica de
Spoligotyping de *Mycobacterium tuberculosis* isolado da população
indígena e não-indígena do Mato Grosso do Sul (MS).”**

Leonardo Biancolino Marino

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clarice Queico Fujimura Leite

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista para obtenção do
grau de Farmacêutico-Bioquímico.

ARARAQUARA - SP

2011

Dedicatória

Aos meus pais Altair Alaor Marino e Silmara Biancolino Marino, pela dedicação e presença constantes em minha vida, pelo apoio e amor incondicional e pela formação do meu caráter, sem os quais nada disso seria possível. Por representarem o meu “porto-seguro”, o meu exemplo e minha maior motivação.

À Querida Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite, que durante esses anos representou muito mais que uma Orientadora, acreditando no meu trabalho e me dando esta oportunidade tão importante em minha vida. Agradeço pelas palavras de incentivo e pela possibilidade de conviver com alguém tão íntegro, que sem dúvida alguma será um dos maiores exemplos que terei para construir minha carreira.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por tudo que sempre me concedeu e me concede, pela capacidade e pela força nos momentos de dificuldade, por me guiar pelos melhores caminhos e por me abençoar a cada dia com seu amor paternal.

Aos meus grandes amigos Adolfo Carlos Barreto Santos, Fernando Rogério Pavan, Marcelo Miyata e Daisy Nakamura Sato, pela paciência, pelos ensinamentos e por tornarem possível a minha continuidade no campo da pesquisa científica. Durante todo esse tempo me passaram valores essenciais de um profissional, com base na competência e experiência que tanto lhes são características.

Às minhas amigas Natália Helena Mendes, Leticia Sumie Sato, Isabella Santos e Heloísa Barbosa de Barros pelos momentos inesquecíveis e pelo ambiente de amizade criado no laboratório.

Ao PIBIC/CNPq, pelo financiamento do Projeto.

Lista de tabelas e figuras

Lista de Siglas e Abreviaturas

Resumo

1. Introdução	11
2. Objetivos	16
3. Material e Métodos	17
3.1. Parecer ético de pesquisa e Isolados de <i>M. tuberculosis</i>	17
3.2. Confirmação da pureza e identificação dos isolados	18
3.3. Técnica de <i>Spoligotyping</i>	21
4. Resultados	23
4.1. PCR- <i>IS6110</i> e PRA	23
4.2. <i>Spoligotyping</i>	26
4.3. Aprendizado com o Projeto	32
5. Conclusão	32
6. Referências Bibliográficas	33
7. Publicações	41

Lista de tabelas e figuras

- Figura 1 Gel de agarose, representando o perfil de 20 amostras positivas para o **24**
Complexo *M. tuberculosis* (amplificação do fragmento de 245 pb).
- Figura 2 Perfis de *PRA* de 3 das amostras submetidas a esta técnica. **24**
- Figura 3 Figura explicativa utilizada pelo banco de dados para interpretação dos **26**
resultados de *PRA*. Tamanhos moleculares podem varia em uma taxa
de + ou – 5 pb, o que não representa um problema na identificação.
- Tabela 1 Tabela resumindo os resultados de Spoligotyping para as 97 amostras. **28**
- Figura 4 Dendrograma correspondente as 97 amostras analisadas por **30**
Spoligotyping.

Lista de Siglas e Abreviaturas

μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
μg	Micrôgrama
A	Adenina
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
C	Citosina
CAS	<i>Central and Middle Eastern Asia</i>
C.F.	Clemente Ferreira
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
dATP	Desoxiadenosina Trifosfato
dCTP	Desoxicitidina Trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina Trifosfato
dTTP	Desoxitimidina Trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DR	<i>Direct Repeat</i>
EAI	<i>East-African Indian</i>
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EST	Estreptomicina
EBM	Etambutol
G	Guanina
H	Haarlem
Hab.	Habitantes

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INH	Isoniazida
IS	Sequência de inserção
LACEN	Laboratório Central
LAM	<i>Latin-American-Mediterranean</i>
L.J.	Löwestein-Jensen
km ²	Quilômetros Quadrados
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MDR	Multi Droga Resistente
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i>
MS	Mato Grosso do Sul
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
nmol	Nanomol
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
PRA	<i>PCR-restriction enzyme pattern analyses</i>
PZA	Pirazinamida
R	Resistente
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIF	Rifampicina
S	Sensível

SDS	<i>Sodium Dodecyl sulfate</i>
<i>Spoligotyping</i>	<i>Spacer Oligonucleotide Typing</i>
SIT	<i>Shared International Spoligotypes</i>
ST	<i>Shared-types</i>
T	Timina
TB	Tuberculose
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
x	Vezes

O presente trabalho baseou-se na análise de amostras de isolados de *M. tuberculosis* provenientes da população indígena e não indígena do Mato Grosso do Sul. As análises foram feitas basicamente por três técnicas de Biologia Molecular: PCR-IS6110 e PRA (para identificação) e *Spoligotyping* (para genotipagem), ressaltando que somente as amostras negativas para PCR-IS6110 foram submetidas ao PRA.

Os objetivos do estudo eram: confirmar por técnicas moleculares de PCR e de PRA a identificação do complexo *M. tuberculosis* e de outras micobactérias, após o descongelamento e cultivo, analisar a incidência de isolados de *M. tuberculosis* da região do Mato Grosso do Sul que não tem o IS6110, avaliar a incidência de outras micobactérias entre a população indígena e não indígena do Mato Grosso do Sul, agrupar em famílias, por similaridade epidemiológica os isolados de *M. tuberculosis* procedentes da população indígena e não indígena com TB e avaliar a presença efetiva de grupos genéticos predominantes;

Pela técnica de PCR-IS6110, analisamos um total de 119 isolados clínicos, sendo que apenas 6 apresentaram negatividade, sendo assim submetidos à técnica do PRA. Feito isso, também apresentaram resultado positivo para CMTB, nos permitindo concluir que essas técnicas podem se tornar ferramentas de grande valia no diagnóstico rápido da TB.

Pela técnica de genotipagem do *Spoligotyping* foram analisadas 97 amostras e foi constatado um maciço predomínio da família LAM, principalmente da subfamília LAM 9, representados por 4 SITs, sendo SIT 42 com 44 isolados e SITs 177, 1337 e 1075 com respectivamente 4, 2 e 1 isolados cada (essa subfamília representou 52,6% do total de isolados). Outras famílias, tais como T, H e U também estiveram presentes no estudo em menores proporções.

1.Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa transmitida pelo ar que pode ser curável, causada pelo *M. tuberculosis*, o “bacilo de Koch”. A principal via de transmissão é de pessoa a pessoa através de partículas infectantes, presente nas gotículas de 1,0 a 5,0 µm de diâmetro, produzidas pelos portadores de TB pulmonar ou laríngea ao tossir, espirrar ou falar (PANDOLFI *et. al.*, 2007). Tal doença é um formidável desafio para a saúde pública, uma vez que contribui consideravelmente para elevadas taxas da doença e morte em todo o mundo. O agente causador mais comum da TB humana, *M. tuberculosis*, é um membro do complexo *M. tuberculosis* (CMTB), que inclui outras seis espécies intimamente relacionadas: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* e *M. canettii*. Todos os membros CMTB são patógenos e podem causar a TB, no entanto, eles apresentam diferentes propriedades fenotípicas e gama de hospedeiros. Geneticamente, os membros do CMTB estão intimamente relacionados. O genoma do *M. tuberculosis* mostra > 99,9% de similaridade com *M. bovis*, a espécie que infecta principalmente bovinos, mas que também pode causar a TB em outros mamíferos inclusive o homem. A atual causa da epidemia de TB está sendo sustentada por dois fatores importantes: o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a crescente resistência das cepas do bacilo contra as drogas da primeira linha de tratamento (Ahmad 2010, Cole *et. al.*, 1998 e Garnier *et. al.*, 2003) . Entre os fatores de risco relacionados com a TB são citados: pobreza, desnutrição, imunodebilidade, ambientes fechados e aglomerados (Santos *et. al.*, 2007).

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), 1,7 milhões de pessoas morreram de TB em 2009, sendo 1,32 milhões de homens e 380000 mulheres, 380000 portadores de HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), com uma média de 4700 mortes por dia. Nesse mesmo

ano, houve 9,4 milhões de novos casos da doença, acometendo 6,1 milhões de homens e 3,3 milhões de mulheres e destes, 1,1 milhões eram portadores de HIV (WHO, 2009).

Com os dados acima, fica evidente o quão alarmante é a situação da TB no mundo, o que faz necessária a adoção de medidas imediatas para o controle da mesma, principalmente no “Mundo subdesenvolvido”. Nesse contexto, a WHO, está trabalhando para reduzir drasticamente a ocorrência da doença no mundo, e reduzir pela metade as mortes e a prevalência de TB em 2015, através da sua estratégia "Stop TB" e apoiar o Plano Global do Stop TB. Seu objetivo é reduzir drasticamente a carga global da TB até 2015, assegurando que todos os pacientes com TB, incluindo, por exemplo, os co-infectados com HIV e aqueles com TB resistente a medicamentos, possam se beneficiar de um acesso a diagnóstico de alta qualidade e centrada no paciente em tratamento. A estratégia também apóia o desenvolvimento de ferramentas novas e eficazes para prevenir, detectar e tratar a TB. Os resultados já podem ser notados: a taxa de óbitos por TB caiu 35% desde 1990, a incidência caiu para 137 novos casos por 100.000 pessoas em 2009 e a taxa de pessoas tratadas e curadas com sucesso chegou ao nível mais alto em 2008, representando 86%. Desde 1995, 41 milhões de pessoas foram tratadas com sucesso e até 6 milhões de vidas salvas por meio do DOTS e da Estratégia Stop TB. 5.800 mil casos de TB foram notificados através de programas DOTS em 2009 (WHO, 2009).

No Brasil, as taxas de incidência e prevalência da doença vêm acompanhando a tendência de declínio mundial. Em 1990, a incidência atingia 84 novos casos por 100000 habitantes, enquanto a prevalência era de 135 por 100.000 habitantes. Passados 19 anos, a incidência caiu para 45 novos casos por 100000 habitantes, enquanto a prevalência está em 50 para 100000 habitantes (WHO, 2009).

Embora o declínio seja iminente em nosso país, algumas estatísticas ainda são preocupantes, como por exemplo os números da TB nas comunidades indígenas. Os dados

nacionais são insuficientes para a compreensão da situação epidemiológica da TB entre os povos indígenas. A incidência da TB nessas populações é elevada e, algumas vezes, os percentuais são dez vezes superiores aos encontrados na população brasileira em geral (Marques *et al.*, 2010). Estima-se que a população indígena brasileira na época do descobrimento do Brasil estava em torno de 5 milhões de pessoas. Calcula-se que, atualmente, esta população foi reduzida a aproximadamente 385 mil índios (PORTAL CIDADÃO – FUNAI, 2008). Além da desnutrição, etilismo, doenças sexualmente transmissíveis, e as entero-parasitoses, a TB acompanha a população indígena desde o seu descobrimento, e foi responsável pela extinção de muitos povos indígenas (SOUSA *et al.*, 1997). A TB em todas as suas formas clínicas nas comunidades indígenas brasileiras, no ano de 2003, alcançou coeficiente de incidência de 193,5 casos por 100.000 habitantes e, se consideradas as formas pulmonares positivas em que o diagnóstico etiológico é mais confiável, a taxa encontrada foi de 108/100.000, superando em muito a incidência nacional que se encontra em torno de 50/100.000 nas populações não indígenas (PORTAL CIDADÃO – FUNAI, 2008).

O estado do Mato Grosso do Sul (MS) contabiliza hoje por volta de 58.000 indígenas, distribuídos em 71 aldeias, falantes de 05 idiomas distintos e 08 povos: Terena, Kadwéu, Kinikinawa, Guató, Ofaié-Xavante, Atikun, Guarani e Kaiowá (PORTAL CIDADÃO – FUNAI, 2008).

No município de Dourados (MS), com a maior população indígena do MS (aproximadamente 12.000 índios), em 1999, a incidência da TB era de 700/100.000 habitantes. A partir do ano de 2002 esta incidência vem declinando, alcançando em 2005 um patamar de 180/100.000hab. O município de Corumbá, também no Mato Grosso do Sul, possui uma incidência de TB de 81,8/100.000hab., que é agravado por apresentar maior número de casos de pacientes multidrogas resistente de MS (SINAN, 2007). Este fato

provavelmente se deve ao fato do município de Corumbá fazer fronteira com a Bolívia que é um país extremamente pobre e com um programa de TB pouco organizado.

Como parte do combate e controle da doença, além do grande auxílio à compreensão da epidemiologia, surgiu, na década de 1980, a utilização de ferramentas de biologia molecular aliadas as técnicas fenotípicas tradicionais já conhecidas, como por exemplo: morfologia de colônias, comparação de taxas de crescimento, susceptibilidade a drogas e testes bioquímicos. Ou seja, antes de métodos moleculares, a compreensão da disseminação de TB foi imprecisa e se baseou em dados observacionais ou correlações com poucos fundamentos. No entanto, dada a multiplicidade de técnicas moleculares disponíveis, é fundamental escolher um método apropriado para abordar uma questão particular do estudo, por exemplo, a dinâmica de transmissão, surtos ou filogenia (Mathema *et. al.*, 2006).

As ferramentas moleculares para o trabalho com *M. tuberculosis* ganharam um grande impulso com a publicação em 1998 do genoma completo da cepa laboratorial H37Rv (Cole *et. al.*, 1998 e Mathema *et. al.*, 2006). Estudos posteriores demonstraram que o genoma entre os membros do Complexo *M. tuberculosis* é altamente conservado, como por exemplo, o que ocorre na região ITS, um espaçador interno de transcrição nesses organismos (Mathema *et. al.*, 2006).

No presente trabalho, foram utilizadas técnicas de biologia molecular, sendo duas para identificação (PCR-IS6110 e PRA - *PCR-restriction enzyme pattern analyses*), e uma para genotipagem (*Spoligotyping*) das cepas provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul.

O IS6110 consiste em uma sequência de inserção da família das IS3, funcionando, na verdade, como um transposon. Essas sequências possuem normalmente menos de 2,5 kb de tamanho, e foram descritas pela primeira vez em *M. tuberculosis* por Thierry *et. al.*, em 1990, que constatou que quando intactas essas sequências são particulares do *M. tuberculosis*. Outra sequência de inserção única do bacilo de Koch é o IS986, que difere do IS 6110 apenas em

três nucleotídeos (van Soolingen, *et. al.*, 1991). Estudos anteriores, mostraram que cepas de *M. tuberculosis* possuem pelo menos uma cópia de IS 6110, usualmente de 6 a 15 cópias, podendo chegar algumas vezes a 20 cópias (Yuen, *et. al.*, 1993). Porém em estudos realizados em dois estados australianos, foram encontradas cepas de *M. tuberculosis* que continham apenas uma ou não continham cópias do IS6110, e que posteriormente foram identificadas como sendo de indivíduos de origem vietnamita (Yuen, *et. al.*, 1993). Em nosso laboratório, em trabalhos retrospectivos, analisando cepas de *M. tuberculosis* provenientes do Sanatório Clemente Ferreira de São Paulo e do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, foi verificado ausência do IS6110 em cerca de 5% das cepas analisadas (dados não publicados). Para estas cepas de *M. tuberculosis* com ausência de IS6110, a confirmação foi feita pela técnica seguinte (PRA) ou por parâmetros bioquímicos através das técnicas tradicionais.

A técnica de PRA foi desenvolvida por Telenti e colaboradores em 1993, consistindo na avaliação do gene que codifica para uma proteína de 65-kDa, a proteína do choque térmico (*heat shock protein*), através da realização de uma PCR para a identificação das espécies de *Mycobacterium*. O gene desta proteína contém “epítomos” que são únicos para determinadas espécies, assim como possui outros “epítomos” comuns a algumas espécies. A natureza conservada do gene permite então a diferenciação de micobactéria dentro de um dia, através da realização de uma digestão com enzimas de restrição dos produtos de PCR, feita com a utilização de *primers* comuns a todas as micobactérias. As enzimas que digerem o fragmento de 439 pares de base são as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII* (Telenti *et. al.*, 1993). Os produtos da digestão, quando separados por eletroforese em gel de agarose a 4%, apresentam perfis específicos de cada espécie de micobactéria (Tortoli *et. al.*, 2003).

Para genotipagem, no presente trabalho foi realizada a técnica de *Spoligotyping* com a finalidade de caracterizar nos isolados identificados como de *M. tuberculosis* por técnicas moleculares, as estirpes circulantes na população indígena e não indígena do Mato Grosso do

Sul. O emprego desta técnica possibilita agrupar os isolados em famílias. Esta técnica, descrita por Kamerbeek *et al.* (1997) é baseada na amplificação *in vitro* de um único *locus* altamente polimórfico no genoma de *M. tuberculosis* contendo múltiplas *direct repeats* – DRs, método que pode ser realizado em laboratórios sem equipamentos sofisticados. A subsequente hibridização diferencial dos produtos amplificados é realizada com oligonucleotídeos complementares às regiões espaçadoras variáveis, localizadas entre as DRs que estão ligados à membrana (Molhuizen *et. al.*, 1998). A presença das seqüências espaçadoras varia entre diferentes cepas e é visualizada por uma mancha em um ponto fixo da membrana de hibridização. O método é simples, rápido e robusto, e muito utilizado em inquérito epidemiológico em larga escala, sendo considerada uma ferramenta de primeira linha para o estudo da diversidade genética de isolados de *M. tuberculosis* (Kanduma *et. al.*, 2003).

Este projeto faz parte do projeto de doutorado intitulado “Genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* provenientes das comunidades indígenas e não indígenas do Mato Grosso do Sul (MS)” e tem aprovação do comitê de ética em pesquisa (CONEP parecer n° 689/2007). O trabalho é de grande interesse em Saúde Pública uma vez que possibilita um diagnóstico rápido da TB bem como o estudo da transmissão e caracterização de genótipos prevalentes de *M. tuberculosis* dentro da população em estudo.

2. Objetivos

Em vista do exposto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a identificação molecular dos isolados clínicos provenientes do Mato Grosso do Sul, pelas técnicas de PCR-*IS6110* e *PRA* e realizar a genotipagem pela técnica do *Spoligotyping* dos isolados de *M. tuberculosis* identificados.

Com este estudo, buscou-se alcançar os seguintes objetivos específicos.

- Confirmar por técnicas moleculares de PCR e de PRA a identificação do complexo *M. tuberculosis* e de outras micobactérias, após o descongelamento e cultivo;
- Analisar a incidência de isolados de *M. tuberculosis* da região do Mato Grosso do Sul que não tem o *IS6110*;
- Avaliar a incidência de outras micobactérias entre a população indígena e não indígena do Mato Grosso do Sul;
- Agrupar em famílias, por similaridade epidemiológica os isolados de *M. tuberculosis* procedentes da população indígena e não indígena com TB;
- Avaliar a presença efetiva de grupos genéticos predominantes;
- Propiciar ao aluno de graduação o aprendizado do manuseio de bactéria nível 3 de segurança biológica (NB3);
- Propiciar ao aluno, o aprendizado das técnicas de biologia e de epidemiologia molecular da TB;
- Propiciar ao aluno, o desenvolvimento científico e crítico dos aspectos concernentes a TB, considerada no Brasil uma das principais doenças negligenciáveis.

3. Material e Métodos

3.1. Parecer ético de pesquisa e Isolados de *M. tuberculosis*

O projeto teve a aprovação do comitê de ética em pesquisa “CONEP parecer nº 689/2007”.

Foram analisados isolados de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes indígenas de aldeias do Mato Grosso do Sul - MS atendidos pelos laboratórios de fronteira LACEN - MS. Nestes, o diagnóstico de TB pulmonar foi suspeitado pelo histórico clínico do paciente e confirmado pelo médico e pelo diagnóstico laboratorial através da baciloscopia, do

isolamento em cultura e da identificação pela metodologia clássica do *M. tuberculosis*. As cepas foram congeladas e estocadas em temperatura -20°C. Esta primeira etapa do trabalho foi realizada no Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN – MS.

3.2. Confirmação da pureza e identificação dos isolados

A reativação e verificação da pureza da suspensão bacteriana foram feitas da seguinte maneira: após o descongelamento à temperatura ambiente, 200µL de cada isolado bacteriano foi colocado em 2,0mL do meio 7H9 enriquecido com OADC (BD BBL®) e acrescido de 20µL do antifúngico Ciclohexemida à 5% e incubado a 37°C por 7 dias, com agitação manual uma vez ao dia. Em presença de turvação, o material foi submetido à confecção de um esfregaço, utilizando uma alíquota de 50µL sendo depositada em uma lâmina, e após o espalhamento, fixada pelo calor e corada pela técnica de Ziehl-Neelsen, para verificação de cultura pura de Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR). Em caso positivo, o conteúdo de 200µL de cada tubo, com cultura supostamente reativada, foi transferido para dois tubos contendo meio sólido de Löwestein-Jensen (LJ) inclinado, sendo incubado por no mínimo 21 dias a 37°C podendo chegar a 60 dias. Após o aparecimento de colônias visíveis o isolado foi submetido à técnica de PCR.

Inicialmente, foi realizada a extração de DNA através da termólise segundo MAZARS, 2001, com pequenas modificações. O procedimento constituiu em submeter, uma alçada da colônia crescida em meio sólido acrescido em 300µL de tampão TE (pH 8,0) em um microtubo com tampa de trava, a três ciclos de fervura por 10 minutos seguido de congelamento a -20°C.

A PCR foi feita segundo VAN EMBDEN *et al.* (1993), com pequenas modificações. Após a multiplicação bacteriana no meio de Löwestein Jensen (LJ), as culturas positivas foram

confirmadas como sendo de *M. tuberculosis* pela técnica de PCR, empregando o par de oligonucleotídeos iniciadores *INS1* (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3') e *INS2* (5'-GCGTAGGCGGTGACAAA-3') que amplifica um fragmento de 245pb específico do complexo *M. tuberculosis* contidos na sequência de inserção *IS6110*.

Para a amplificação (VAN EMBDEN *et al.*, 1993), em linhas gerais, no volume final da reação de 25µL, foram adicionados 21,5µL de “Master Mix” (PROMEGA® na diluição de 2 partes de PCR Master Mix 2x para 1 parte de água ultrapurificada, contendo: *Taq* DNA Polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões reacionais), 0,5µL dos oligonucleotídeos iniciadores *INS1* e *INS2* na concentração de 20µM e 2,5µL do DNA de cada amostra, extraído por termólise, e a mistura da reação foi amplificada no Termociclador empregando o seguinte protocolo de ciclagem: 1 ciclo de 10 minutos à 95 °C (para desnaturação da dupla fita de DNA), seguido de 30 ciclos de 1 minuto à 94 °C (para desnaturação da dupla fita a cada ciclo), 2 minutos à 56 °C (para hibridização dos oligonucleotídeos) e 1 minuto a 72 °C (para alongação da polimerização), finalizando com 10 minutos à 72 °C (para assegurar o processo e aumentar eficiência) e mantido sob refrigeração à 4 °C até o momento da revelação.

Na sequência, 15µL do produto amplificado foram aplicados em gel de agarose a 1% contendo 4µL de Brometo de etídio na concentração de 10µg/mL, e o produto da amplificação resolvido por eletroforese a 90 volts e padrão de peso molecular de 50 pares de bases aí adicionado. A eletroforese foi fotodocumentada, empregando o equipamento Alpha Imager – Alpha Innotech®. A presença de um produto de amplificação de 245 pares de base confirmou a identificação de *M. tuberculosis*.

Os isolados cujo produto de amplificação esteve ausente, foram submetidos a técnica do *PRA* para identificação da espécie. A técnica do *PRA* foi realizada segundo PLIKAYTIS *et al.* (1992) e TELENTI *et al.* (1993).

Utilizando o DNA extraído por termólise descrito anteriormente, os isolados foram submetidos à PCR para amplificação do gene *hsp65* produzida com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores *Tb11* (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') e *Tb12* (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3'). Empregando volume final de 30µL em cada reação, foram utilizados 27µL de Master Mix (PROMEGA®) na diluição recomendada pelo fabricante de 1 parte de Master Mix 2x para 1 parte de água ultra-pura, e 0,25µL (25pmoles) de cada oligonucleotídeo iniciador (*Tb11* e *Tb12*) e 2,5µL do DNA extraído por termólise. Para a amplificação foram utilizados o seguinte protocolo de ciclagem: 1 ciclo de 10 minutos à 94 °C, seguido de 45 ciclos de 1 minuto à 94 °C, 1 minutos à 60 °C e 2 minutos a 72 °C, finalizando com 10 minutos à 72 °C e mantido sob refrigeração à 4 °C até o momento da revelação.

10µL dos produtos dessa amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 6,0µL brometo de etídio (10µg/mL) e em seguida fotodocumentada. Os isolados que apresentaram amplificados fragmentos de 439 pares de base foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*.

Para cada enzima de restrição foi feita uma reação com volume final de 20µL. Acrescidos em 7,5µL de água ultrapurificada (MiliQ), 2,0µL do tampão da enzima, 0,5µL de cada enzima (*BstEII* e *HaeIII*) e 10µL do produto amplificado. Para a digestão, a enzima *BstEII* foi incubada a 60°C por 1 hora e para a *HaeIII* a 37°C também por 1 hora. Após a incubação, os produtos digeridos foram submetidos a nova eletroforese em gel de agarose, porém agora a 4%, e a coloração com o brometo de etídio. Junto com o produto da digestão foi aplicado no gel padrões de peso molecular de 25 e de 50 pares de base. Após a eletroforese o gel foi fotodocumentado.

A interpretação dos resultados foi feita através de um site desenvolvido por alguns Institutos de pesquisa internacionais em parceria com o Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - SP) denominado PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

O PRASITE consiste em uma página de internet onde é possível inserir os perfis encontrados após a digestão do produto amplificado pelas enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*. A página informa a identificação da micobactéria com o perfil eletroforético informado.

3.3. Técnica de *Spoligotyping*

Esta técnica foi realizada segundo KAMERBEEK *et al.* (1997). Para a amplificação das regiões espaçadoras entre as DR foram utilizados os *primers Dra* (5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3') e *DRb* (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3') e 1µL do DNA genômico extraído. A ciclagem no termociclador consistiu em 1 ciclo de 15 minutos à 95°C, 20 ciclos de 1 minuto à 95°C, 1 minuto à 55°C e 30 segundos à 72°C, finalizando com 1 ciclo de 5 minutos a 72°C. Mantidos a temperatura de 4°C até o momento do uso.

Para a hibridização, a membrana foi previamente lavada por 5 minutos à 65°C com 250 mL de SSPE 2x SDS 0,1% e posicionada sobre o suporte *cushion* no *miniblotter* (Immunetics®), de forma que os canais ficassem perpendiculares à sua aplicação, sendo então parafusada no *miniblotter*. Os produtos da PCR foram desnaturados por 10 minutos a 100°C no termociclador e colocados imediatamente no gelo. Cada um dos canais foi preenchido com o produto da PCR diluído e desnaturado, evitando-se formação de bolhas. Os canais negativos foram preenchidos com 150µL de SSPE 2x SDS 0,1%. Os resíduos de líquidos presentes em cada canal na membrana foram aspirados. O *miniblotter* foi incubado por 60 minutos à 60°C na posição horizontal e sem agitação. Antes da remoção da membrana do *blotter*, todos os

canais foram aspirados utilizando bomba à vácuo. A membrana após duas lavagens de 10 minutos à 60°C com 250 mL de SSPE 2x SDS 0,5% pré-aquecido, foi transferida para o *rolling bottle* até o resfriamento. Adicionou-se à membrana, 10 mL de SSPE 2x SDS 0,5% com 10µL de estreptavidina incubando-a no forno de hibridação à 42°C por 45 à 60 minutos. A membrana foi submetida à duas lavagens com 250mL de SSPE 2x SDS 0,5% por 10 minutos à 42°C e duas lavagens com 250 mL de SSPE 2x por 5 minutos a temperatura ambiente, além de incubação por 1 minuto com 20 mL da mistura ECL, retirando-se o excesso de líquido em papel. A membrana, coberta com plástico PVC, foi colocada em cassete e, em sala escura, adicionado o filme de raio-x. A membrana ficou exposta por 20 a 30 minutos antes de sua revelação, seguindo instruções do fabricante.

A membrana foi analisada de 3 em 3 espaçadores, onde para cada espaçador um valor é atribuído, 4, 2 e 1 respectivamente. Em presença dos espaçadores, os valores foram somados, por exemplo, se o isolado apresentar os 3 espaçadores o valor será 7, se o isolado não apresentar o segundo espaçador o valor será 5, e a interpretação é realizada até obter o número de 15 dígitos para cada isolado. Spoligotipos comuns a mais de um isolado foi designado de “*Shared Type*” (ST) e atribuídos a eles, um número “*Shared International Type*” (SIT) de acordo com a base de dados internacional SpoIDB4.0 e comparado com SITVIT, que é uma versão atualizada do banco de dados SpoIDB4.0 (Brudey *et. al.*, 2006), disponível em [HTTP://www.pasteur.guadelupe.fr.8081/SITVITdemo/index.jsp](http://www.pasteur.guadelupe.fr.8081/SITVITdemo/index.jsp). Com o auxílio do SpoIDB4.0 e do SITVIT, os spoligotipos foram agrupados em famílias e subfamílias. Para spoligotipos não relatados no SpoIDB4.0 e SITVIT, o banco de dados Spotclust foi utilizado (VITOL *et. al.* 2006), que tem como base o banco de dados SpoIDB3.0, disponível em [HTTP://cgi2.cs.rpi.edu/~bennek/SPOTCLUST.html](http://cgi2.cs.rpi.edu/~bennek/SPOTCLUST.html). O Spotclust permite verificar a porcentagem de similaridade do ST com as subfamílias já existentes. Determinado o perfil,

cada família foi analisada comparativamente empregando o programa Bionumerics, Euclidiana (Applied Maths®) e construído um dendrograma de acordo com a similaridade genética.

4. Resultados e Discussões

4.1. PCR-*IS6110* e PRA

Foram analisados 119 isolados clínicos identificados como de *M. tuberculosis* por ensaios fenotípicos, provenientes de pacientes do Estado do Mato Grosso do Sul (indígenas e não indígenas) pelo método de PCR-*IS6110*. Em 113 (94,96%) desses isolados foi verificado resultado positivo para Complexo *M. tuberculosis* já nessa primeira técnica. Os outros 6 isolados (5,04%), com resultado negativo pela técnica de PCR-*IS6110*, foram submetidos à técnica do PRA.

A positividade para o *IS6110* foi evidenciada pelo aparecimento de banda nítida de 245pb no gel de agarose a 1% (Fig.1). No PRA os resultados foram dependentes da análise do tamanho dos fragmentos no gel de agarose a 4%, após a utilização das duas enzimas de restrição (*BstEII* e *HaeIII*), além do auxílio de um banco de dados denominado PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>). Os 6 isolados clínicos negativos para *IS6110*, forneceram os seguintes perfis no PRA: bandas de 245/115/85 pb para a enzima *BstEII* e 150/120/70 pb para a enzima *HaeIII* (Fig. 2). Junto ao PRASITE os fragmentos gerados pelas enzimas de restrição confirmaram a identificação desses seis isolados como sendo membros do Complexo *M. tuberculosis*.

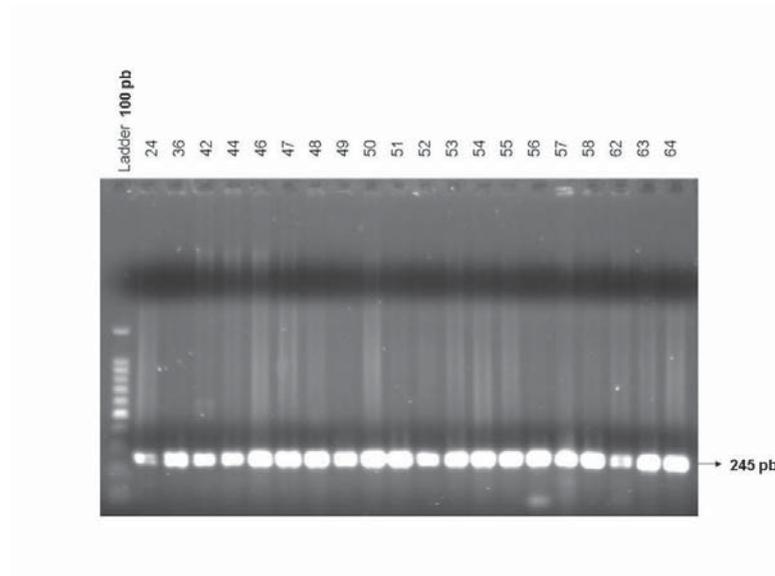


Fig. 1: Gel de agarose, representando o perfil de 20 amostras positivas para o Complexo *M. tuberculosis* (amplificação do fragmento de 245 pb).

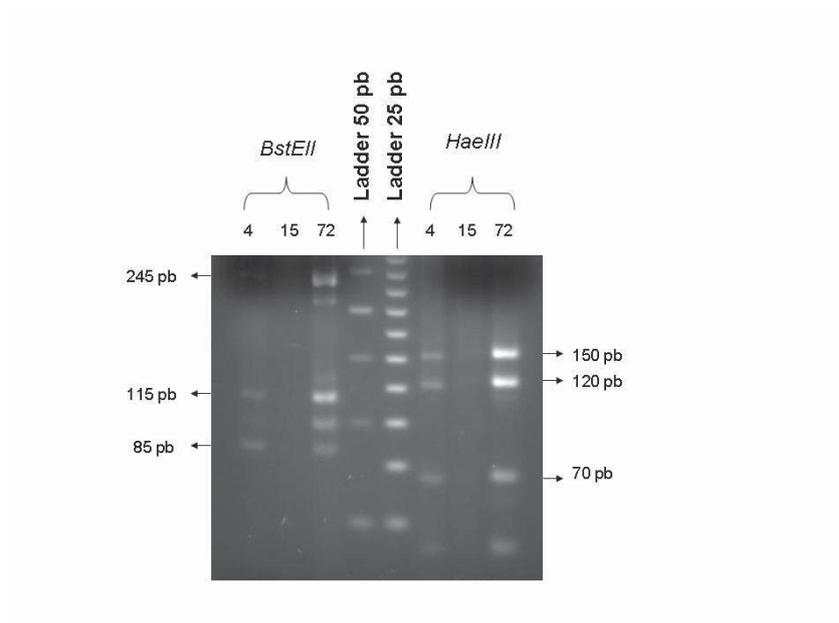


Fig. 2: Perfis de PRA de 3 das amostras submetidas a esta técnica.

Empregando apenas a técnica do PCR-*IS6110* a partir da cultura, foi possível identificar *M. tuberculosis* em 94,96% dos isolados clínicos, em um dia de jornada de trabalho. Associando

o ensaio do PRA, foi alcançada 100% de identificação em três dias de trabalho, tornando o emprego das duas técnicas de biologia molecular ferramenta altamente promissora na identificação rápida e acurada dos membros do Complexo *M. tuberculosis*. Para a mesma identificação do Complexo *M. tuberculosis* pelas técnicas fenotípicas convencionais são necessários pelo menos 14 dias de jornada de trabalho (Gurung *et. al.*, 2010).

A porcentagem de isolados clínicos do Complexo *M. tuberculosis* que não apresentam cópias da IS6110, foi de aproximadamente 5% (6/119), com respeito a população do Mato Grosso do Sul (a maioria da região de Dourados). Este resultado é compatível com os obtidos previamente em nosso laboratório: em estudos anteriores no Sanatório Clemente Ferreira de São Paulo e do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), encontramos aproximadamente 5% das cepas com ausência da sequência de inserção. Estudos posteriores no SESA (2002 a 2006) apresentaram 7,4% das cepas com ausência de IS6110 e no Sanatório Clemente Ferreira (período 2006 a 2008) nenhuma cepa apresentou ausência do IS6110. Yuen *et. al.*, 1993, observou em pacientes de origem vietnamita, uma porcentagem maior de 9,75% (4/41) de isolados que não continham tal sequência de inserção. Nos estudos de van Soolingen *et. al.*, 1993, ficou evidente o quanto a presença de um baixo número de cópias do IS6110 pode dificultar um diagnóstico ou o estudo dos polimorfismos. Nesse estudo, 21 das 63 cepas provenientes do sul da Índia (33,33%) apresentavam apenas uma cópia do transposon, e uma das amostras não apresentava nenhuma cópia.

Com essa adversidade, surgiram outras propostas de identificação molecular de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis*. Lazzarini *et. al.*, 2007, utilizaram a IS1561 para a identificação das estirpes circulantes no Rio de Janeiro. Porém, em 30% (121/404) das amostras essa sequência (IS1561) também estava ausente, provavelmente por deleções ou modificações em 10 genes causadas pela recombinação de homólogos de 2 genes similares codificadores de proteínas. Estas cepas foram denominadas como RD^{Rio}, apresentando como

ancestral comum um membro com “spoligotipo” da família LAM (Latin American-Mediterranean). As cepas RD^{Rio} foram identificadas como o principal grupo causador de TB no Rio de Janeiro, podendo estar associadas a perfis de cepas multidrogas resistentes.

No contexto dos nossos estudos, a técnica de PRA possibilitou confirmar a identificação dos 6 isolados clínicos com ausência de *IS6110* como de *M. tuberculosis*. Essa técnica desenvolvida por Telenti *et. al.* (1993), possibilita ainda a identificação da maioria das espécies do gênero *Mycobacterium* em menor tempo. Atualmente a identificação das espécies micobacterianas é realizada por inúmeros testes fenotípicos (Gurung *et. al.*, 2010), bem como empregando técnicas de hibridização (Mathema *et. al.*, 2006). Entretanto na técnica do PRA permanece a mesma desvantagem da PCR-*IS6110*, uma vez que ambas não diferenciam as espécies dentro do Complexo *M. tuberculosis*. Técnica semelhante já havia sido proposta por Plikaytis, porém ao invés de utilizar as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*, foram utilizadas *BstNI* e *XhoI*. A figura 3 é uma representação esquemática utilizada pelo banco de dados para interpretação dos resultados de PRA.

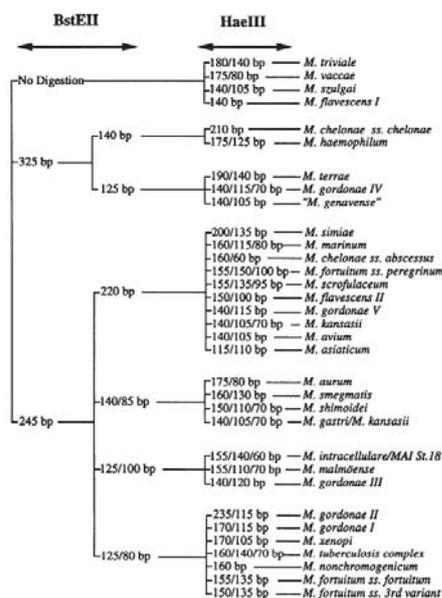


Fig. 3: Figura explicativa utilizada pelo banco de dados para interpretação dos resultados de PRA. Tamanhos moleculares podem varia em uma taxa de + ou – 5 pb, o que não representa um problema na identificação.

4.2. Spoligotyping

Para a determinação dos genótipos, foram submetidas pela técnica de Spoligotyping, um total de 97 isolados clínicos de *M. tuberculosis*, provenientes da população indígena e não indígena do Estado do Mato Grosso do Sul. Os resultados são apresentados pela tabela 1 e figura 4. Foram encontrados 33 perfis diferentes, sendo que 30 destes já presentes no banco de dados SpolDB4.0. Os outros 3 perfis, por não apresentarem família no SpolDB4.0, foram analisados pelo SpolDB3.0, que é um banco de dados que nos dá a porcentagem de similaridade genética de um determinado perfil ainda não relatado com um perfil ou família já reconhecidos pelo SpolDB4.0.

Dentre os 30 perfis encontrados no SpolDB4.0, foi observado um predomínio notável da família LAM, ou Latin American Mediterranean (65 amostras, correspondendo a 67%). A subfamília de maior expressão foi a LAM9, representados por 4 SITs, sendo SIT 42 com 44 isolados e SITs 177, 1337 e 1075 com respectivamente 4, 2 e 1 isolados cada (essa subfamília representou 52,6% do total de isolados). Na sequência, a família com maior número de isolados foi a família T, com 21 isolados, correspondendo a 21,65% do total. A subfamília T1 foi a mais predominante, com 19 isolados, agrupados nos seguintes SITs : 53 (6 isolados), 291 (2), 535 (2), 1800 (2) e os demais SITs (86, 1053, 174, 154, 1166 e 1284) com 1 isolado cada. As famílias Haarlem e S também apareceram como estirpes circulantes na população, com porcentagens de 4,12% e 2,06% respectivamente, sendo também identificados 2 isolados (2,06%) definidos como “não designado “U” no SpolDB4.0 .

Dentre os 3 isolados sem SITs que foram analisados no SpolDB3, dois deles apresentaram 99% de similaridade com respectivas subfamílias T1 e EAI, e o ultimo, 76% com a H1. É

Os resultados deste trabalho apresentam grande similaridade com os demais realizados em outras regiões brasileiras e na América do Sul. Noguti *et al.* (2010), na cidade de Maringá-PR, avaliando 93 isolados clínicos de *M. tuberculosis*, encontraram os mesmos genótipos verificados na população do Mato Grosso do Sul, incluindo o achado de um isolado da família EAI. No estudo de Malaspina *et al.* (2008) na cidade de Araraquara, a T1 foi a subfamília mais freqüente onde predominaram os SITs 53 e 535 de forma coincidente ao nosso trabalho. O SIT 42 (de maior expressão em nosso estudo), da subfamília LAM 9, também foi verificado no trabalho de Malaspina *et al.* (2008). A predominância das 3 famílias (LAM, T e Haarlem) foi também verificada por Arenas *et al.* (2008) na Colômbia e Aristimuño *et al.* (2006) na Venezuela. Porém, na América do Sul, o trabalho de Candía *et al.* (2007), realizado no Paraguai é o que apresenta os genótipos mais semelhantes ao nosso achado, onde houve predominância do SIT 42 da subfamília LAM9 e outros genótipos comuns aos dois trabalhos, tais como SITs: 4, 17, 20, 33, 34, 47, 53, 60 e 177.

O dendrograma representado pela figura 4 mostra o grau de correlação genética entre os 97 isolados:

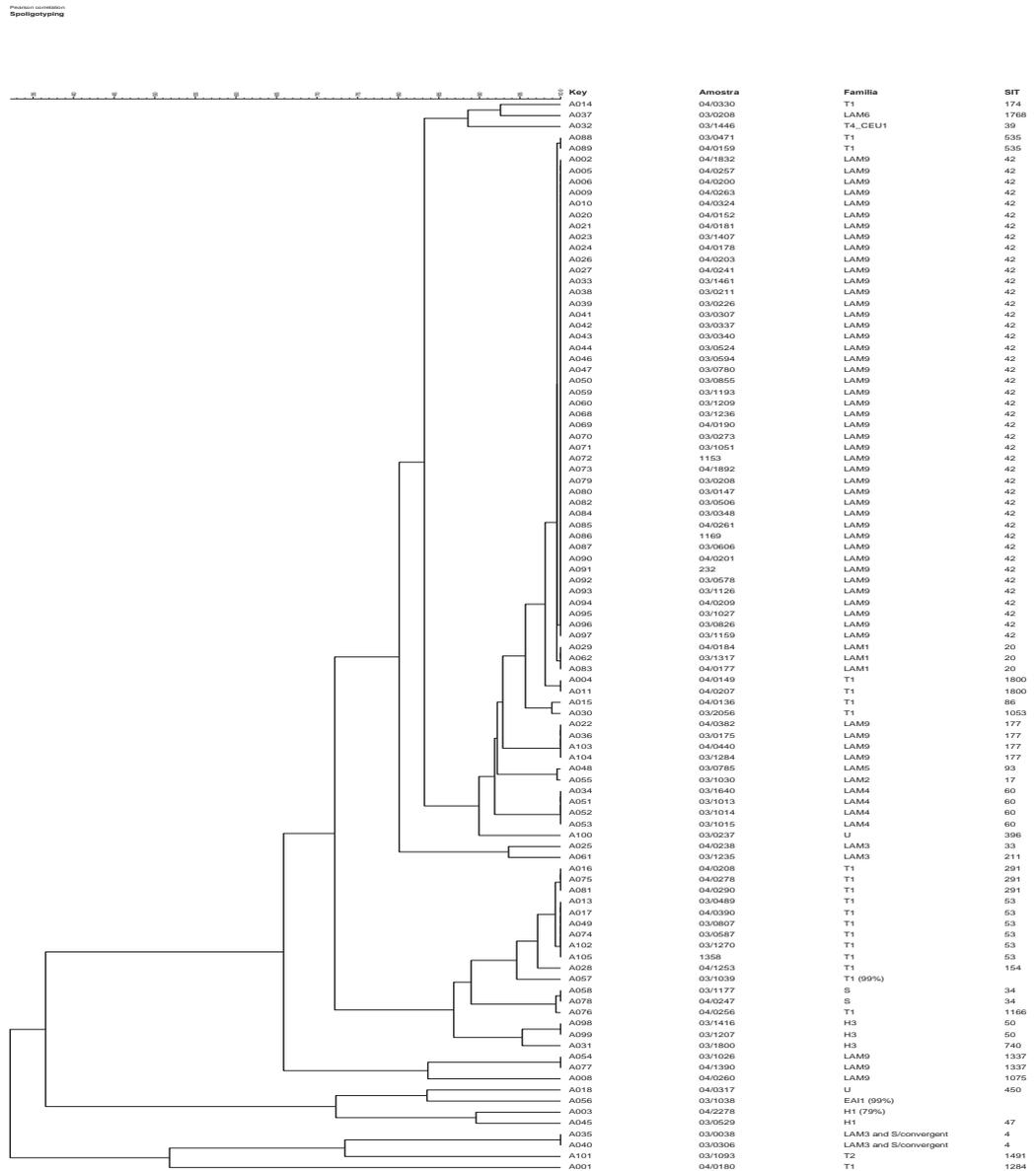


Fig. 4: Dendrograma correspondente as 97 amostras.

Outro fator que deve ser ressaltado é a presença de uma cepa analisada e que apresenta similaridade genética de 99% com T1, segundo o banco de dados SpoIDB3.0. Podemos observar que esta cepa apresenta a diferença de apenas um espaçador com o perfil de uma cepa T1 de SIT 462 (não apresenta o 23º espaçador, que está presente no SIT 462), de acordo

com o SpolDB4.0. Isto pode ser decorrente de uma mutação que possa estar ocorrendo para uma melhor adaptação da estirpe em questão na região.

Quanto à estabilidade dos genótipos e sua distribuição geográfica, os estudos indicaram que 61,7% de todos os isolados cujos genótipos foram identificados pelo SpolDB4.0, estavam enquadrados em apenas 4 SITs (42, 177, 60 e 53). Borsuk *et. al.* (2005), e David *et. al.* (2007) encontraram 7 e 8 SITs respectivamente, compondo 50% dos isolados estudados. Destaca-se neste trabalho a alta prevalência de SIT 42 (45,36%) da subfamília LAM 9. Segundo Lazzarini *et al.* (2007), os pacientes que apresentaram TB causada pelo bacilo pertencente à família LAM, apresentaram maior hemoptise, maior perda de peso e maior carga bacteriana em seus escarros. Neste sentido a predominância do SIT 42 neste trabalho pode ser em decorrência do maior grau de virulência deste genotipo. Este SIT, juntamente com SITs 53, 60 e 177 são ubiqüitários, de ampla distribuição mundial (Sola *et. al.*, 2001). Para Malaspina *et. al.*, (2008), o ST53 é o segundo isolado mais freqüente no SpolDB4.0, sugerindo ser um isolado de fácil transmissão e adaptabilidade. Desta forma os estudos indicam que em cerca de 60% dos casos de TB que acometem a população de Mato Grosso do Sul, é em decorrência destes 4 SITs predominantes, que pertencem as famílias de evolução mais recente e que aparentemente são mais prevalentes ao redor do mundo.

Vale ressaltar que as famílias encontradas no presente estudo apareceram como causadoras da doença em ambas as populações estudadas (indígenas e não indígenas), não existindo famílias infectantes de uma população em particular. Tal evidência pode estar inclusa no contexto de inserção do índio no mercado de trabalho da população não indígena, no qual ele adquire a doença e pode então transmiti-la à sua tribo.

4.3. Aprendizado com o Projeto

Pelo lado científico, o projeto proporcionou ao aluno de Iniciação Científica grande crescimento e amadurecimento. Por empregar técnicas de biologia molecular o aluno desenvolveu destreza e cuidados no manuseio. A manipulação de bactéria patogênica de nível 3 de segurança biológica, estimulou ao aluno, senso de responsabilidade e seriedade. O conhecimento e emprego das ferramentas de Biologia Molecular propiciarão ao aluno maior embasamento e facilidade no desenvolvimento de futuras pesquisas, pois estas metodologias são consideradas de ponta num trabalho científico.

Pelo lado humano, talvez este seja o item mais importante, incluindo o exercício e o crescimento da visão humanitária e social, fatos que deveriam ser considerados em todas as áreas da ciência, a partir da consciência do quanto um estudo pode interferir e auxiliar na vida de uma sociedade extremamente carente, ainda mais no caso de uma doença negligenciada como a TB.

5. Conclusão

Com o presente trabalho, podemos concluir que técnicas de biologia molecular, tais como PCR-*IS6110* e PRA podem se tornar ferramentas de grande valia no diagnóstico rápido, possibilitando tratamento adequado e redução na transmissão, diminuindo assim a incidência de TB e facilitando o seu controle em populações acometidas pela doença. São técnicas altamente promissoras, pois podem reduzir o tempo de identificação de 15 dias (por técnicas clássicas, envolvendo baciloscopia e provas bioquímicas) para 2 ou 3 dias, permitindo uma identificação muito rápida e acurada do *M. tuberculosis*.

Concluimos também que os mesmos grupos genéticos de *M. tuberculosis* infectam tanto a população indígena quanto a não indígena, causando TB na população do Mato Grosso do

Sul. Num contexto mais abrangente, estes genótipos também acometem a população brasileira e populações de todo o continente sul americano, indicando como principais fatores de transmissão o grande fluxo de pessoas entre as regiões e a carência de políticas de tratamento e controle mais eficientes da doença.

A predominância do SIT 42 pode também estar relacionada com maior infecciosidade e virulência deste isolado clínico, havendo necessidade de analisar no futuro, os perfis de sensibilidade/resistência frente às drogas de tratamento deste genótipo como de SITs de todas as famílias encontradas.

6. Referências Bibliográficas

AHMAD S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Clin Dev Immunol.** 2011; v.2011: 814943.

ARENAS, N.E.; TORRES, E.; DURANGO, C.J.; CUERVO, L.I.; CORONADO, S.M.; GÓMEZ, A. Búsqueda Activa de Individuos con Tuberculosis Pulmonar y Extrapulmonar en Calarcá-Quindío, Colombia-2005. **Rev. salud pública.** 10 (2):279-289, 2008.

ARISTMUÑO, L.; ARMENGOL, R.; CEBOLLADA, A.; ESPAÑA, M.; GUILARTE, A.; LAFOZ, C.; LEZCANO, M.A.; REVILLO, M.J.; MARTÍN, C.; RAMÍREZ, C.; RASTOGI, N.; ROJAS, J.; SALAS, A.V.; SOLAS, C.; SAMPER, S. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the First National Survey of Anti-tuberculosis Drug Resistance from Venezuela. **BMC Microbiology** 2006, 6:90, 2006.

BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, M.M.; MADEIRA, S.G.; LIMA, C.; BOFFO, M.; MATTOS, I.; SILVA, P.E.A.; DELLAGOSTIN, O.A. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. **Microbes Infect.**, n.7, p. 1338–1344, 2005.

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J.R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W.M.; GORI, A.; ALHAJOJ, S.A.; ALLIX, C.; ARISTIMUÑO, L.; ARORA, J.; BAUMANIS, V. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international Spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiol.**, v. 6, p. 6-23, 2006.

CANDIA N.; LOPEZ B.; ZOZIO T.; CARRIVALE M.; DIAZ C.; RUSSOMANDO G.; DE ROMERO N.J.; JARA J.C.; BARRERA L.; RASTOGI N.; RITACCO V. First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. **BMC Microbiol** 7:75, 2007.

COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY III, C.E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; BARRELL B.G., *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature** 393:537–544. (Erratum, 396:190.), 1998.

DAVID, S.; RIBEIRO, D.R.; ANTUNES, A.; PORTUGAL, C.; SANCHO, L.; SOUSA, J.G. Contribution of spoligotyping to the characterization of the popular structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. **Infect. Genet. Evol.**, n. 7, p. 609-617, 2007.

FERDINAND, S.; VALÉTIUDIE, G.; SOLA, C.; RASTOGI. Data mining of *Mycobacterium tuberculosis* complex genotyping results using mycobacterial interspersed repetitive units validates the clonal structure of spoligotyping-defined families. **Res. Microbiol.**, n. 155, p. 647–654, 2004.

FILLIOL, I.; DRISCOLL, J.R.; van SOOLINGEN, D.; KREISWIRTH, B.N.; KREMER, K.; VALÉTIUDIE, G.; ANH, D.D.; BARLOW, R.; BANERJEE, D. *et al.* Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 11, p. 1347-1349, 2002.

GARNIER T.; EIGLMEIER K.; CAMUS J.C.; MEDINA N.; MANSOOR H.; PRYOR M.; DUTHOY S.; GRONDIN S.; LACROIX C.; MONSENPE C.; SIMON S.; HARRIS B.; ATKIN R.; DOGETT J.; MAYES R.; KEATING L; WHEELER P.R.; PARKHILL J.; BARRELL B.G.; COLE S.T.; GORDON S.V.; HEWINSON R.G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 June 24; 100(13): 7877–7882.

GURUNG R.; BHATTACHARYA S.K.; PRADHAN B.; GURUNG S.; SINGH Y.I. Phenotypic characterisation and drug sensitivity testing of mycobacteria isolated from extra pulmonary tuberculosis. **Kathmandu Univ Med J (KUMJ).** 2010 Jan-Mar;8(29):57-61.

KAMERBEEK J.; SCHOOLS L.; KOLK A.; VAN AGTERVELD M.; van SOOLINGEN D.; KUIJPER S.; BUNSCHOTEN A.; MOLHUIZEN H; SHAW R.; GOYAL M.; van EMBDEN J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 4, p. 907-914, 1997.

KANDUMA, E.; MCHUGH, T.D.; GILLESPIE, S.H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user's guide. **J. App. Microbiol.**, v. 94. p. 781-91, 2003.

LAZZARINI L.C.; HUARD R.C.; BOECHAT N.L.; GOMES H.M.; OELEMANN M.C.; KUREPINA N.; SHASHKINA E.; MELLO F.C.; GIBSON A.L.; VIRGINIO M.J.; MARSICO A.G.; BUTLER W.R.; KREISWIRTH B.N.; SUFFYS P.N., LAPA E SILVA J.R.; HO J.L. Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol.** 2007 Dec;45(12):3891-902. Epub 2007 Sep 26.

MALASPINA, A.C.; CAVALCANTI, H.R.; LEITE, C.Q.; MACHADO, S.M.; VIANA, B.H.; SILVA, R.M.; HAGE, E.F.; FIGUEIREDO, W.M.; MARQUES, E.; FERRAZOLLI, L.; ARBEX, M.; LESSI, M.; FONSECA, L.S.; RIGOUTS, L.; SAAD, M.H. Usefulness of *Mycobacterium tuberculosis* Molecular Typing in a Tuberculosis Low-Endemic Agro-Industrial Setting of Brazil. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 61, p. 231-233, 2008.

MARQUES A.M.; POMPILO M.A.; dos SANTOS S.C.; GARNÊS S.J.; da CUNHA R.V. Tuberculosis among Brazilian indigenous individuals aged less than 15 years-old in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2010 Dec;43(6):700-4.

MATHEMA B.; KUREPINA N.E.; BIFANI P.J.; KREISWIRTH B.N. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. **Clin Microbiol Rev.** 2006 Oct;19(4):658-85. Review.

MAZARS, E.; LESJEAN; BANULS, A.L.; GILBERT, M.; VINCENT. V.; GICQUEL, B.; TIBAYRENC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **PNAS.**, v. 98, n. 4, p. 1901-1906, 2001.

MOLHUIZEN H.O.; BUNSCHOTEN A.E.; SCHOULS L.M.; VAN EMBDEN J.D. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by spoligotyping. **Methods Mol Biol.** v.101 p.381-394, 1998.

NOGUTI, E. N.; LEITE, C.Q.F.; MALASPINA, A.C.; SANTOS, A.C.B.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; MAMIZUKA, E. M.; CARSOSO, R. F. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from low endemic setting in south of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 2010.

PANDOLFI, J.R.; MALASPINA, A.C.; SANTOS, A.C.B.; SUFFYS, P.N.; OELLEMANN, M.A.C.; VALENTINI, S.R.; LEITE, C.Q.F. TB e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 28, n. 3, p.251-257, 2007.

PLIKAYTIS B.B.; PLIKAYTIS B.D.; YAKRUS M.A.; BUTLER W.R.; WOODLEY C.L.; SILCOX V.A.; SHINNICK T.M. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. **J Clin Microbiol.** 1992 Jul;30(7):1815-22.

PORTAL CIDADÃO – FUNAI site: <http://www.funai.gov.br/> . Acessado em 10 de janeiro de 2009.

SANTOS M.L.G.; VENDRAMINI S.H.F.; GAZETTA C.E.; OLIVEIRA S.A.C.; VILLA T.C.S. Poverty: socioeconomic characterization at tuberculosis. **Rev Lat Am Enfermagem.**; v.15 Spec p.762-767, 2007.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação, site: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/> . Acessado em 10 de janeiro de 2009.

SOUSA A.O.; SALEM J.I.; LEE F.K.; VERÇOSA M.C.; CRUAUD P.; BLOOM B.R.; LAGRANGE P.H.; DAVID H.L. An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. **Proc Natl Acad Sci U S A.**v.94, n.24, p.13227-3232, 1997.

TELENTI A.; MARCHESI F.; BALZ M.; BALLY F.; BÖTTGER E.C.; BODMER T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J Clin Microbiol.** 1993 Feb;31(2):175-8.

THIERRY, D.; CAVE M.D.; EISENACH K.D.; CRAWFORD J. T.; BATES J. H.; GICQUEL B.; GUESDON J.L. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Nucleic Acids Res.** 18:188, 1990.

TORTOLI E. *Mycobacterium kansasii*, species or complex? Biomolecular and epidemiological insights. **Kekkaku**. 2003 Nov;78(11):705-9.

van EMBDEN, J.D.A.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.D.; DALE, J.W.; EISENACH, K.D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; McADAM, R.; SHINNICK, T.M.; SMALL, P.M. Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.

van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P.W.M.; DE HAAS, P.E.W.; SOLL, D.R.; van EMBDEN, J.D.A. Occurrence and stability of insertion sequences in *M. tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 2578-2586, 1991.

van SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E.W.; HERMANS, P.W.M.; GROENEN, P.M.A.; van EMBDEN, J.D.A. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 1987-1995, 1993.

VITOL, I.; DRISCOLL, J.; KREISWIRTH, B.; KUREPINA, N.; BENNETT, K.P. Identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex strains families using spoligotypes. **Infect. Genet. Evol.** v. 6. n. 6, p. 491-504, 2006.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data - Global tuberculosis Control: surveillance, planning, financing: WHO report 2009 - <http://apps.who.int/ghodata/?vid=500> . Acessado em 10 de maio de 2011.

YUEN, L.K.; ROSS, B.C.; JACKSON, K.M.; DWYER, B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strain from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 6, p. 1615-1618, 1993.

7. Publicações

O período de iniciação científica que permitiu a realização deste trabalho, possibilitou também a participação na seguinte publicação: Miyata M, *et. al.* Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil: Phenotypic and genotypic methods. **Biomed Pharmacother** (2011), doi:10.1016/j.biopha.2011.04.021.

Além disso, o trabalho apresentado nesta monografia encontra-se em um período de adequação para uma futura publicação.