

Tipagem molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes atendidos na cidade de Goiânia – GO pelo método de Miru-VNTR e comparação com a técnica de RFLP-IS6110

Alyne Melo PEREIRA, André KIPNIS, Lorena Cristina dos SANTOS, Ana Paula JUNQUEIRA-KIPNIS

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - UFG

yulelyne@hotmail.com

Palavras-chave: Tuberculose, RFLP-IS6110, Miru-VNTR, Genotipagem.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença bacteriana crônica, infecto-contagiosa, que tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* (Schuster, 1995). Apesar de quase 130 anos de pesquisas, desde a descoberta do bacilo, a doença continua a ser uma grande ameaça à saúde global e é uma das principais causas de morte, particularmente nos países em desenvolvimento (Lew *et al*, 2011).

Estima-se que em 2009, foram notificados 5,8 milhões de novos casos no mundo, sendo 80% destes, concentrados em 22 países (WHO, 2010). O Brasil integra esse grupo, ocupando a 19ª posição com uma incidência de 71,7 mil novos casos por ano. Em Goiás, a incidência anual é de aproximadamente 14,6 casos para cada 100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2010).

A doença é especialmente endêmica em países em desenvolvimento ligados a epidemia da AIDS, desnutrição, com pouco acesso aos serviços de saúde, superlotação e más condições de vida nos grandes centros urbanos (Sola *et al*, 2003). Outra preocupação para controle da TB é o aparecimento cada vez mais freqüente de cepas multi- resistentes a drogas (MDR-TB).

Métodos de tipagem molecular têm sido úteis para determinar a origem de uma infecção, possíveis relações filogenéticas entre cepas e traçar cadeias de transmissão (Choi *et al*, 2011). A técnica de polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição seguido de hibridização com o elemento de inserção 6110 (RFLP-IS6110) foi determinada como a técnica padrão mundial (Kanduma *et al*, 2003). Esta técnica apresenta dificuldades como, não ser útil para isolados com baixo número de cópias IS6110, ser muito onerosa, requerer o cultivo das micobactérias de crescimento lento, e sofrer com dificuldades de interpretabilidade e portabilidade dos complexos padrões de bandas (Supply *et al*, 2006).

Outras técnicas moleculares tem sido investigadas para auxiliar nos estudos, e a VNTR (número variável de repetições em tandem) que analisa polimorfismos do número de repetições que ocorre em diversos *locus* (Supply *et al*, 2000), tem mostrado poder discriminatório semelhante ou maior que o RFLP-IS6110 (Supply *et al*, 2006), e por ser baseada em amplificação por PCR, requer menores quantidades de DNA e conseqüentemente menos manipulações de cultivo. Neste trabalho pretendemos comparar os perfis genotípicos obtidos pelas duas técnicas, para determinar a relação genética entre os isolados de *M. tuberculosis*, comparar os resultados, identificar possíveis *clusters* de transmissão, assim contribuindo com os programas de controle da TB tanto regional quanto nacional para que se possam estabelecer estratégias e ações eficazes.

Metodologia

Genotipagem por RFLP: Em um estudo prévio (Santos *et al*, 2008), foram coletadas 175 amostras de escarro em um Hospital de Referência de Goiânia, de acordo com suspeita clínica de tuberculose, no período de janeiro de 2006 a junho de 2007. Destas amostras, 27 apresentaram cultura negativa para *M. tuberculosis*, seis amostras foram identificadas como micobactérias atípicas, e 16 não obtiveram perfis confiáveis pela técnica, resultando em 126 isolados analisados. A análise foi realizada de acordo com protocolo de van Soolingen *et al*, 1994. Em cada gel de DNA foi incluído como controle positivo uma cepa de referência Mt14323. Os padrões de RFLP-IS6110 foram introduzidos no software *Bionumerics* (Windows versão 4.0, Applied Maths), e uma matriz de similaridade e o dendrograma foram construídos usando o coeficiente de DICE e o método de UPGMA, respectivamente, com uma posição de tolerância de 1,5%.

Genotipagem por Miru-VNTR: O número de cópias de repetições em tandem de 15 *loci* Miru-VNTR foi determinado por PCR e verificados em gel de agarose. Os sistemas de PCR e os oligonucleotídeos iniciadores usados seguiram o protocolo descrito por Supply *et al* (2006). Os tamanhos dos produtos em cada *locus* foram determinados por comparação com um marcador de 100pb de DNA (Invitrogen). Os números de alelos foram então determinados de acordo com a tabela de Supply (2005) e analisados no software QuantityOne 4.6.7 (BioRad). A cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv foi usada como controle positivo. O dendrograma (gerado usando análises UPGMA) e a diversidade alélica foram analisados usando o site

vntrplus.org. Os *Clusters* foram verificados visualmente para coerência e definidos quando dois isolados ou mais possuíam 100% de similaridade.

Resultados

Os perfis genéticos de 105 amostras colhidas entre os meses de janeiro de 2006 a julho de 2007 foram comparados. Houve prevalência de tuberculose em indivíduos do sexo masculino (78,2%) economicamente ativos, com uma média de idade de 40 anos.

De acordo com as características genéticas obtidos com a técnica de RFLP-IS6110, 58 isolados apresentaram perfis únicos, não se agrupando em nenhum *cluster*, enquanto 47 agruparam-se em 21 *clusters* distintos, sendo um *cluster* com quatro isolados, dois com três amostras cada e dezessete com duas amostras cada. O poder discriminatório da técnica foi 0,9941.

A análise dos padrões de VNTR demonstrou que 89 isolados tiveram perfis únicos, enquanto 16 se agruparam em sete *clusters* distintos, sendo os dois maiores com três amostras cada e os outros cinco com dois perfis idênticos. O poder discriminatório da técnica foi 0,998. O *locus* mais discriminatório foi o Mtub04.

Das 105 amostras, 63 perfis concordantes foram encontrados entre as duas técnicas, e 42 apresentaram discordâncias.

Foram identificados linhagens genéticas pela técnica Miru-VNTR, quando comparadas com o banco de dados no site Miru-VNTRplus, com perfis similares a cepas das famílias LAM e Haarlem, incluindo quatro isolados agrupados em dois *clusters*.

Discussão

Estudos usando métodos moleculares tem sido descrito em algumas cidades brasileiras (Nogutti *et al*, 2010; Cardoso *et al*, 2011), com bons resultados discriminatórios. A importância de se definir métodos efetivos, mais ágeis, com menor custo e bons resultados aumentam as chances de cura, melhorias no controle, e vigilância da doença. Este estudo com *M. tuberculosis* isolados em Goiás é pioneiro, e a técnica de Miru-VNTR mostrou-se mais discriminatória que a técnica de RFLP, semelhante ao encontrado em outros estudos (Mazars *et al*, 2001).

Os resultados anteriores obtidos com a técnica de RFLP sugeriram pequenos surtos entre os pacientes envolvendo diferentes linhagens de *M. tuberculosis* devido a predominância de pequenos agrupamentos (Santos *et al*, 2008). A análise das mesmas amostras pela técnica de Miru-VNTR, permitiu observar que não existem

focos recentes de transmissão da doença, corroborando nossa hipótese de que os casos de TB em Goiás seriam provenientes de reativação endógena de infecção latente adquirida anteriormente (Tenover *et al*, 2007), já que a maioria dos isolados apresentaram perfis únicos.

O encontro de maior número de isolados semelhantes à família LAM (15,3%) está de acordo com o observado em algumas cidades do país (Cardoso, 2011).

Conclusões: Os isolados analisados sugerem ausência de transmissão recente da TB em Goiás. A técnica Miru-VNTR demonstrou melhor discriminação que a RFLP-IS6110, com boa eficiência para caracterizar agrupamentos.

Apoio Financeiro: CNPq

Referências Bibliográficas

- Cardoso Oelemann M, Gomes H M, Willery E, *et al*. The Forest behind the Tree: Phylogenetic Exploration of a Dominant *Mycobacterium tuberculosis* Strain Lineage from a High Tuberculosis Burden Country. 2011. *PLoS ONE* 6(3):e18256.
- Choi G E, Jang M H, Cho H J, *et al*. Application of Single-nucleotide Polymorphism and Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats Analyses to Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Korea. 2011. *Korean J Lab Med*. 31(1):37-43.
- Kanduma E, McHugh T D and Gillespie S H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. 2003. *J Appl Microbiol* 94(5): 781-791.
- Lew J M, Kapopoulou A, Jones L M, *et al*. TubercuList - 10 years after. 2011. *Tuberculosis (Edinb)*. 91(1):1-7.
- Mazars E, Lesjean S, Banuls A L, *et al*. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. 2001. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:1901-1906.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Relatório Técnico de Tuberculose. 2010. Disponível:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tb_julho10_certo_22_07_2010.pdf
- Noguti E N, Leite C Q F, Malaspina A C, *et al*. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Paraná in Southern Brazil. 2010. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 105: 779-785.

- Santos L C. Caracterização molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia-GO pela técnica do RFLP-IS6110. 2008. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.
- Sola C, Filliol I, Legrand E, *et al.* Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. 2003. *Infect Genet Evol.* 3(2):125-133.
- Supply P. Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Technical Guide. 2005. Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille. Available online at: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRUVNTRtypingmanualv6.pdf>
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, *et al.* Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. 2000. *Mol Microbiol.* 36(3):762-771.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, *et al.* Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. 2006. *J Clin Microbiol.* 44(12):4498-4510.
- Schuster, M. Mycobacterial disease: a historical and epidemiologic perspective. 1995. *Clin Dermatol.* 13(3):191.
- Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. 1997. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 18(6):426-439.
- van Soolingen D, de Haas P E, Hermans P W, *et al.* DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. 1994. *Methods Enzymol.* 235: 196-205
- World Health Organization. Global tuberculosis control, 2010.