

---

MÉTODOS APLICADOS

---

À EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

---

DO *Mycobacterium tuberculosis*

---

Lorena Cristina Santos,<sup>1</sup> Ana Paula Junqueira Kipnis<sup>1</sup> e André Kipnis<sup>1</sup>

RESUMO

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com *Mycobacterium tuberculosis*, resultando em dois milhões de mortes anualmente. No mundo, são registrados mais de oito milhões de novos casos de tuberculose por ano e o Brasil é um dos principais países nos quais ocorrem tais registros. Os fatores determinantes para o controle da tuberculose são: a detecção rápida, a terapia adequada e os meios de se evitar futuras transmissões. A caracterização de linhagens por tipagem molecular é um instrumento útil nessas investigações epidemiológicas. Existem vários métodos de tipagem molecular para a caracterização destas linhagens. O IS6110-RFLP é a técnica padronizada mundialmente. Algumas técnicas, como *spoligotyping*, VNTRs-MIRUs, entre outras, têm representado alternativas para análises de isolados de *M. tuberculosis* geneticamente relacionados, especialmente em casos em que a análise de IS6110-RFLP não é aplicável. Nesta revisão, foram consultadas publicações relevantes sobre o assunto, em periódicos especializados, a fim de se obter maior compreensão sobre as técnicas de genotipagem do *Mycobacterium sp* e suas respectivas vantagens e limitações.

DESCRITORES: *Mycobacterium tuberculosis*. Epidemiologia. Tipagem molecular.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma das principais doenças infecciosas do mundo. Tem-se estimado que um terço da população mundial esteja infectada com *Mycobacterium tuberculosis*, o que resulta em dois milhões de mortes anualmente (3). Em 1993, a OMS declarou a tuberculose como emergência global e, desde então, vem desenvolvendo políticas para contê-la.

---

1 Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG).

Endereço para correspondência: André Kipnis, rua 235, esquina c/1.ª Avenida, Setor Universitário. CEP 74.605-050, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: akipnis@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em 6/11/2006. Revisto em 20/4/2007. Aceito em 23/4/2007.

A tuberculose atingiu proporções alarmantes e hoje é considerada uma calamidade pública em virtude da redução dos investimentos em pesquisas durante duas décadas, sobretudo, desde a implantação da rifampicina na quimioterapia de curto prazo para tuberculose, a partir da década de 1960, quando se acreditava que a doença estivesse sob controle (20). Somaram-se a isso a combinação de fatores demográficos, os movimentos populacionais, a expansão da epidemia do HIV e o aumento da resistência às drogas. Além do mais, estima-se que se a efetividade do controle da tuberculose não obtiver melhoras substanciais, o número de casos novos passará dos 200 milhões em 2001 para perto de um bilhão de novas pessoas infectadas no ano de 2020 (30). O Brasil está entre os principais países que registram esses casos, ocupando a 15ª posição entre as regiões com a maior prevalência da doença (48).

Apesar de o agente causador da tuberculose humana ser altamente infectante, sua capacidade de desenvolver a 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 combinação entre fatores ambientais, características do hospedeiro e da linhagem do *M. tuberculosis*. Fatores sociais típicos de nações em desenvolvimento, como pobreza, desnutrição, estresse, superpopulação e exposição a micobactérias ambientais, influenciam a susceptibilidade à tuberculose (4, 13, 43). 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 (21, 28).

Adicionalmente, a emergência e a disseminação de linhagens de *M. tuberculosis* multiresistentes a drogas (MDR-TB) também se tornaram uma séria ameaça para o controle da tuberculose. A falta de novos agentes terapêuticos para a MDR-TB e a necessidade de desenvolver métodos de diagnóstico molecular rápidos e eficientes têm estimulado, nos últimos anos, o delineamento das bases genéticas moleculares da resistência do *M. tuberculosis* (46) às drogas.

A identificação de linhagens constitui um método adicional útil em investigações epidemiológicas, pois é um meio para se entender melhor os mecanismos que influenciam a dinâmica de transmissão e a identificação dos fatores de risco em uma comunidade. Esta identificação permite a elaboração de um modelo adequado de medidas de controle, além de poder ser usada para investigar propriedades biológicas das linhagens, como virulência e patogenicidade (31).

Algumas das principais características epidemiológicas que são elucidadas com estas técnicas moleculares são: determinação da origem de uma infecção em um paciente (familiar ou comunitária); disseminação e detecção precoce de organismos que adquiriram resistência a antibióticos (1, 19); discriminação entre doença endógena e exógena (9, 42), além de casos de contaminação cruzada em laboratório (8).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a diferenciação de isolados clínicos baseados no polimorfismo genético de DNA do *M. tuberculosis* (DNA *fingerprint*). Os primeiros trabalhos para a determinação de polimorfismo genético de *M. tuberculosis* utilizaram tipagem por fago (38). Esta técnica foi usada para analisar a heterogeneidade entre colônias individuais do bacilo obtidas de culturas isoladas de esquimós. Concluiu-se 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 pela baixa sensibilidade do método (30).

Recentemente, os estudos epidemiológicos da tuberculose foram facilitados graças à aplicação de marcadores moleculares linhagem-específicos (56). O desenvolvimento desses métodos e a utilização de DNA *fingerprint* têm permitido a distinção dessas linhagens. Quando duas ou mais linhagens têm o perfil *fingerprint* idêntico ou muito similar, infere-se que elas pertençam a um mesmo grupo. Com isso, linhagens isoladas de diferentes pacientes, mas pertencentes a um mesmo grupo podem ter elevada probabilidade de serem epidemiologicamente associadas, isto é, podem refletir transmissão recente entre os pacientes (27).

A análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição baseados em IS6110 (IS6110 - *Restriction Fragment length polymorphism*-RFLP) é considerada atualmente a técnica padrão para a comparação de isolados de *M. tuberculosis* (56). Outras técnicas, como *spoligotyping* (29) e, mais recentemente, a tipagem baseada no número variável de repetições em *tandem* (VNTRs- *Variable Number of Repeats Tandem*) de unidades repetitivas intercaladas de micobactérias (MIRUs - *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) têm representado alternativas para análises de isolados de *M. tuberculosis* geneticamente relacionados (24, 39, 52), especialmente nos casos em que a análise com a utilização de IS6110-RFLP não é aplicável ou quando os resultados desta análise são de difícil interpretação. Nos casos de infecção simultânea por duas ou mais linhagens de *M. tuberculosis*, são necessárias várias técnicas de DNA *fingerprints* (49).

Os métodos de tipagem molecular são também úteis para a diferenciação dos membros do complexo *M. tuberculosis*. Estes consistem em quatro espécies relacionadas: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium africanum* (55), as quais, apesar de demonstrarem diferenças fenotípicas, possuem um elevado grau de identidade genética (18). Os genomas dessas espécies são ricos em DNA repetitivo (11), fato que tem sido explorado pela tipagem molecular. Os conhecimentos adquiridos a partir dessas análises permitiram a discriminação entre as espécies, bem como correlacioná-las com as características clínicas da doença, além de fornecerem dados como patogenicidade, adaptação ao hospedeiro e origem (47).

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 seguida de hibridização com sondas (IS6110), *spoligotyping* e MIRU-VNTR.

## MÉTODOS NA ANÁLISE DE POLIMORFISMO DO DNA

### 1. Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

A diferenciação de linhagens do complexo *M. tuberculosis* pelo uso de tecnologia baseada em ácidos nucleicos 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 particulares (*PvuII*, por exemplo), resultando em fragmentos de restrição de DNA que são separados por eletroforese em gel de agarose (12, 45). A Figura 1 esquematiza as etapas necessárias.



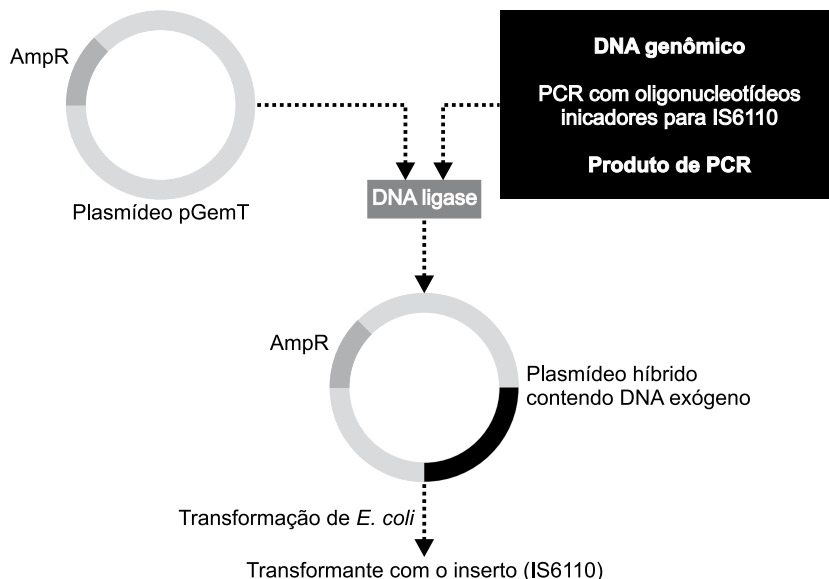
*Figura 1.* Esquema ilustrativo da técnica do RFLP. Os DNAs extraídos de *M. tuberculosis* provenientes de culturas são digeridos *in vitro* com enzimas de restrição. O produto da digestão é separado por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo e, posteriormente, analisado para a comparação dos perfis de digestão.

Embora esta técnica seja rápida, a interpretação dos resultados do RFLP é difícil em razão do grande número de fragmentos gerados, o que resulta em padrões complexos de difícil diferenciação e baixo poder discriminatório (30).

#### 1.1. RFLP seguido de hibridização

O RFLP seguido de hibridização se baseia na presença de elementos transponíveis (seqüências de inserção) no genoma do *M. tuberculosis* (56) ou seqüências repetitivas do genoma, que podem ser evidenciadas após o emprego de endonucleases de restrição (Figura 1). Para a execução desta técnica, os elementos repetitivos de DNA são clonados e usados como sondas para se visualizar somente os fragmentos de restrição que contenham a seqüência complementar para a sonda (53). 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*. A clonagem e a obtenção das sondas estão exemplificadas na Figura 2.

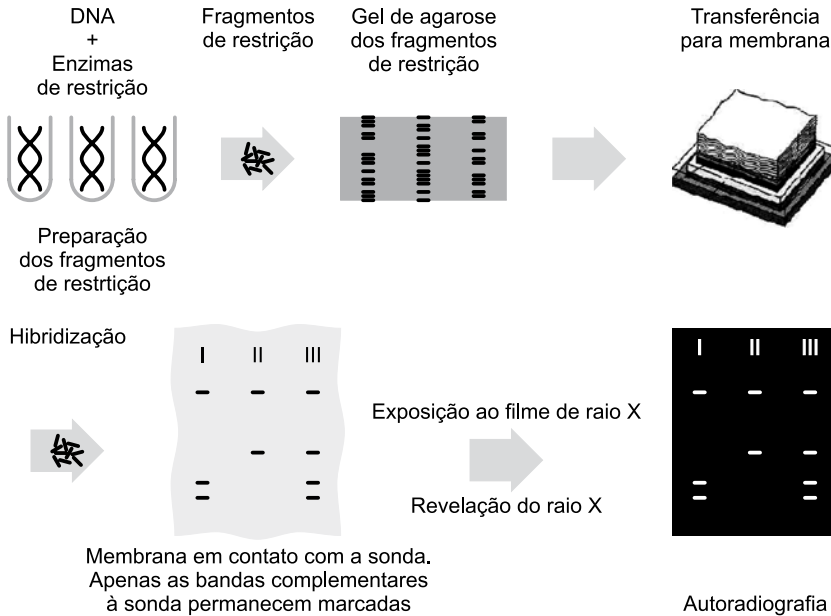


**Figura 2.** Esquema de clonagem da seqüência do IS6110 no plasmídeo pGemT para obtenção da sonda IS6110. O DNA genômico da cepa padrão H37RV é amplificado por PCR com oligonucleotídeos específicos para a região IS6110 e o produto é ligado ao plasmídeo pGemT por uma enzima DNA ligase, resultando em um plasmídeo que contém o inserto.

O IS6110 é uma seqüência de 1.361 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 dependente (30), portanto o IS6110 RFLP é amplamente aplicado na diferenciação de isolados (44). A técnica é de fácil comparação porque, geralmente, apresenta bandas hibridizadas com igual intensidade, diferentemente de outras técnicas como o *spoligotyping* (32). Por 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 ser variável, de 0 a 25 cópias, a posição desses elementos no genoma também é variável, ampliando 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 que contêm IS6110 se dá por meio 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 (56). A Figura 3 ilustra uma reação visualizada por quimioluminescência.



**Figura 3.** Esquema de hibridização para obtenção do perfil de bandas. DNA de culturas isoladas de *M. tuberculosis* são digeridos com enzima PvuII, separados por eletroforese em gel de agarose e, posteriormente, transferidos para a membrana. Esta é incubada com sondas complementares para IS6110 previamente marcadas. Após a hibridização e a lavagem da membrana, o substrato quimioluminescente da sonda marcada é adicionado e a membrana é exposta a um filme de raios X, que revelará a presença dos fragmentos que contêm seqüências IS6110.

As maiores desvantagens dessa técnica referem-se à exigência de cultura de várias semanas, com organismos viáveis para a obtenção de DNA em grande quantidade e de elevada qualidade, além de seu alto custo. 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 cinco cópias). As posições das bandas nestas cepas apresentam menor polimorfismo, portanto baixo poder discriminatório (6, 37).

Uma importante implicação de DNA *fingerprint* RFLP-IS6110 para tuberculose é sua habilidade em mensurar a diversidade de linhagens de *M. tuberculosis*, incluindo diferenças por região, população e, possivelmente, prevalência de linhagens endêmicas (40). Esta diversidade foi demonstrada nos EUA por análises de genotipagem em bases de dados, em que 10.883 pacientes tuberculosos, representando aproximadamente 11,6% de todos os casos novos daquele país de 1996 a 2000, resultaram em 6.128 amostras distintas (35).

## MÉTODOS BASEADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Técnicas de tipagem mais rápidas têm sido desenvolvidas e a maioria delas fundamenta-se na amplificação baseada no método da PCR. Estes métodos têm sido vantajosos para tipificar *M. tuberculosis* diretamente em amostras clínicas, dispensando a etapa de crescimento do microrganismo além da possibilidade de serem usadas em isolados não mais viáveis para cultivo. Algumas destas técnicas, contudo, carecem de reprodutibilidade ou têm menor poder discriminatório que RFLP-IS6110 (32). Existem vários métodos baseados na tipagem molecular utilizando-se PCR, dentre eles *spoligotyping* e um número variável de repetições em *tandem* (VNTR) se mostram os mais promissores.

### 1. Spoligotyping

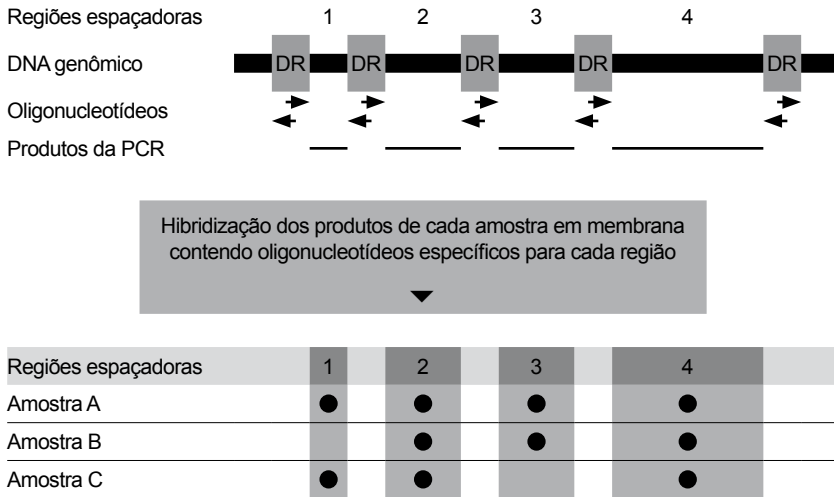
O método *spoligotyping* tem sido usado para acompanhar linhagens com diferentes aplicações epidemiológicas (59). Por sua simplicidade é freqüentemente utilizado para a tipagem do complexo *M. tuberculosis*. Além disso, ele é usado também como um método de tipagem adicional para linhagens com menos de cinco cópias de IS6110 (6, 25, 51).

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 intercaladas com espaços de seqüências não repetitivas de 34-41pb múltiplas e bem conservadas. Estas regiões foram descritas pela primeira vez flanqueando uma seqüência IS6110 (41).

As linhagens variam em número de DRs e presença ou ausência de espaços particulares (29). A técnica envolve a amplificação das regiões espaçadoras entre os DRs (Figura 4), para posterior hibridização em uma membrana que contenha oligonucleotídeos específicos para as diferentes seqüências espaçadoras, previamente ligados covalentemente. O resultado é obtido mediante a hibridização ou não de cada seqüência espaçadora, resultando em um padrão de hibridização que é comparado entre as diferentes amostras (27).

O polimorfismo é proporcionado por estes espaços, os quais são variáveis em comprimento (de 34 a 41) (57), seqüência e número. Embora

esses espaços variem, cada um é comum para um grupo de linhagens (25). 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 entre as linhagens de *M. tuberculosis*, cada cópia DR dentro do locus DR é um potente alvo para a amplificação por PCR (29).



**Figura 4.** Esquema representativo da amplificação por PCR entre as seqüências DRs utilizadas na técnica do spoligotyping. Dois oligonucleotídeos iniciadores são utilizados para amplificar as regiões espaçadoras entre regiões DRs, um no sentido 5'-3' e outro reverso, 3'-5', resultando em fragmentos de diversos tamanhos, dependendo da presença ou ausência destas regiões no genoma que serão reveladas após hibridização.

Quando usado em associação com outras técnicas alternativas ao RFLP-IS6110, o *spoligotyping* se mostra uma técnica rápida, efetiva e econômica (7, 34). Entretanto, sua utilização em substituição à técnica do RFLP IS6110 deve ser considerada com precaução (60), visto que uma proporção de linhagens com diferenças no perfil do marcador genético RFLP-IS6110 exibem perfis idênticos de *spoligotyping* (17). Segundo estudos realizados por Salmoniere et al. (1997) (25), o *spoligotyping* se mostrou 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 apresentem diferentes perfis de *spoligotyping*, também revelarão, sem exceção, diferentes RFLPs IS6110.



## 2. Número variável de repetições em tandem (VNTR)

Loci genéticos contendo VNTR formam a base do mapeamento genético humano. Muitos genes de importância médica têm sido identificados por mapeamento baseado em suas ligações no locus VNTR. Este método também é aplicado em medicina forense e em testes de paternidade (2, 22, 23, 26).

Loci de repetição em *tandem*, similares aos minissatélites em eucariotos, também têm sido identificados em bactérias do complexo *M. tuberculosis*. Estes VNTRs freqüentemente se diferem em número de cópias entre os isolados (24). Estas estruturas consistem em seqüências repetitivas de 40-100pb, chamadas de MIRUs (*Mycobacterial interspersed repetitive units*) encontradas dispersas no genoma do complexo *M. tuberculosis* (36, 52). Um estudo recente no genoma do *M. tuberculosis* H37Rv revelou que 12 dos 41 loci MIRUs presentes constavam no genoma de isolados não relatados de diferentes regiões geográficas e que a tipagem com o uso destes 12 loci proporcionou uma resolução comparável ao RFLP-IS6110. Estes alvos, portanto, são promissores para o desenvolvimento de um método com alta resolução, conveniência e grandes aplicações para tipagem (39).

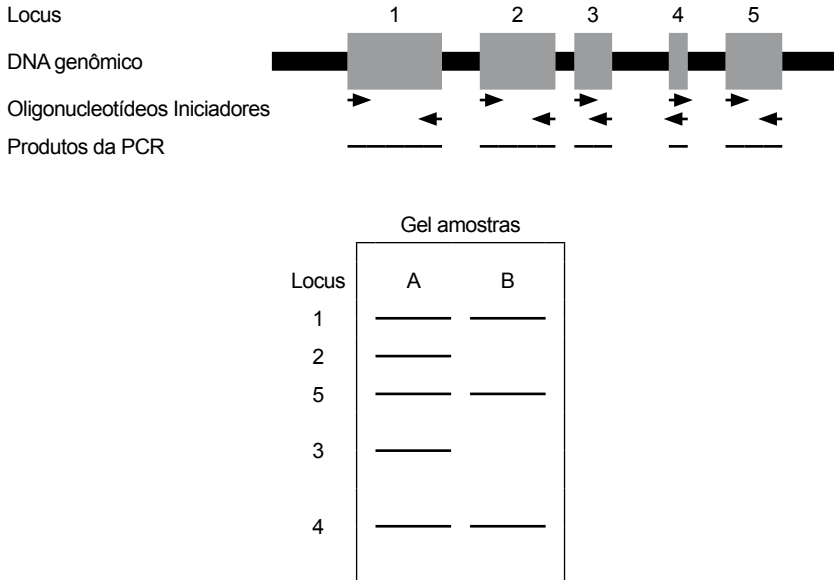
Estudos realizados por Domenech et al. localizaram VNTRs tanto em regiões codificantes quanto em regiões intergênicas do *M. tuberculosis* H37RV. Todos os loci VNTR reportados, presentes em regiões codificantes, tinham tamanhos repetidos e eram múltiplos de três nucleotídeos. Parece que, em algumas bactérias patogênicas, VNTRs em regiões codificantes proporcionam grandes variações em proteínas envolvidas na patogenicidade, as quais podem ajudar o patógeno a se adaptar melhor e a 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* (39). 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 destinados para cada locus uma reação de PCR e um gel, como mostra a Figura 5. Com base no conhecimento do tamanho de diferentes repetições em *tandem*, o número de repetições é calculado de acordo com dados já publicados (16). Esta tipagem tem se mostrado muito informativa, pois se baseia na repetição do número de cópias em loci específico.

A identificação do loci VNTR-MIRU mostrou ser igualmente aplicável para tipagem de *Mycobacterium bovis*, o qual tem demonstrado ser de difícil tipagem pelos métodos existentes (14, 15, 16, 50). Esta técnica tem discriminação similar ao RFLP IS6110 em linhagens com grande número de cópias do elemento IS6110 e se mostra melhor quando as linhagens possuem número reduzido de cópias (33).

O *M. bovis* infecta humanos freqüentemente pelo consumo do leite fresco de vacas e não usualmente de pessoa para pessoa. As infecções por este patógeno são geralmente encontradas em sítios extrapulmonares. O RFLP IS6110 não é

um método muito adequado para a investigação do *M. bovis*. Isso ocorre porque proporções significativas dessas linhagens isoladas de humanos contêm somente uma cópia do elemento IS6110, que está em uma posição fixa do genoma (15). O VNTR-MIRU, quando comparado com RFLP-IS6110 e *spoligotyping*, produz amostras mais distintas (5, 16). Segundo um consenso recente da União Européia sobre a determinação de novos marcadores e técnicas para epidemiologia e controle da tuberculose, o método de tipagem VNTR-MIRU poderá substituir o IS6110 em um futuro próximo (30).



*Figura 5.* Esquema representativo da amplificação utilizada pela técnica VNTR. Oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada locus VNTR resultarão em amplificação de acordo com a presença ou ausência do alvo. Após realizar a PCR para os vários loci, a análise é feita em gel de agarose para visualizar os produtos esperados. Cada linhagem apresentará um perfil de acordo com as regiões VNTRs presentes em seu genoma.

## ANÁLISE COMPARATIVA DAS DIFERENTES TÉCNICAS DE TIPAGEM MOLECULAR

Kremer et al. (1999) avaliaram diferentes métodos de tipagem de *M. tuberculosis*, de acordo com seus graus de reprodutibilidade, diferenciação e

especificidade. 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. Dessas amostras, 90 linhagens eram de *M. tuberculosis*, dentre as quais 31 amostras estavam em duplicata e outras dez eram de espécies diferentes do *M. tuberculosis*.

A reprodutibilidade das técnicas foi analisada comparando-se as amostras em duplicata. Os resultados obtidos por RFLP-IS6110 foram 100% reprodutíveis. Das amostras analisadas por métodos baseados em PCR, a reprodutibilidade variou entre 6% e 97%. A tipagem realizada por VNTR apresentou apenas um par de amostras em duplicata com discordância, obtendo um grau de reprodutibilidade de 97%. Quando a análise foi realizada por *spoligotyping*, as amostras apresentaram um grau de 94% de identidade (das 31 amostras, 29 foram idênticas).

O RFLP-IS6110 obteve o maior grau de discriminação das 90 linhagens do complexo *M. tuberculosis* analisado, apresentando 84 tipos diferentes; o *spoligotyping*, 61 tipos e VNTR, 56 diferentes linhagens.

Contudo, apesar de o RFLP ser altamente reprodutível e discriminatório é pouco útil para tipar linhagens que contenham baixo número de cópias IS6110 (6, 33). Para a análise da especificidade dos métodos testados, foram utilizadas aquelas dez linhagens de cinco espécies diferentes não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. Os métodos RFLP-IS6110 e *spoligotyping* não se mostraram úteis para tipificar estas linhagens, sendo, portanto, específicos para *M. tuberculosis*.

## CONCLUSÕES

Estes estudos reforçam a consideração do RFLP, seguido de hibridização IS6110, como a técnica padrão para tipificar linhagens do complexo *M. tuberculosis* mundialmente. O RFLP constitui uma técnica de elevada reprodutibilidade, sensibilidade, além de ser muito específica. Tais vantagens do RFLP-IS6110 podem ser perdidas quando se trata de linhagens com baixo número de cópias da sequência de inserção. Nestes casos, contudo, há a alternativa da utilização de outras técnicas, como *spoligotyping* e VNTR, por exemplo.

Durante os últimos anos, *fingerprint* tem sido utilizado para melhorar a definição dos fatores de risco na transmissão da TB e, atualmente, é aceita a hipótese de que linhagens pertencentes a um mesmo grupo estão relacionadas com transmissões recentes entre os pacientes que as possuem. Há estreita relação entre a tipagem por RFLP e a origem geográfica das linhagens de *M. tuberculosis*, sendo, portanto, determinantes para os programas de controle da tuberculose de cada país (10, 54, 57, 58, 61).

Os métodos de tipagem molecular têm, assim, importância preponderante no que diz respeito ao monitoramento da transmissão da tuberculose nos países endêmicos.

## ABSTRACT

Methods employed in the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*

Almost one third of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* which results in two millions of deaths annually. Every year, eight million of new tuberculosis cases are reported worldwide and Brazil is one of the main contributing countries for those cases. Key factors for controlling tuberculosis are: rapid detection, adequate therapy, and means to avoid further transmissions. Strain characterization by molecular typing has become a useful tool in epidemiological investigations. There are several methods for molecular typing of these strains, IS6110-RFLP being considered the gold standard. Some methods, such as spoligotyping, VNTRs-MIRUSs, among others, have proved to be useful as an alternative in cases where IS6110-RFLP is not applicable. In order to broaden our understanding about *Mycobacterium sp* genotyping techniques, as well as their limitations and advantages, several relevant publications about this matter are presented and discussed in this review.

KEY WORDS: *Mycobacterium*. Epidemiology. Molecular typing.

## REFERÊNCIAS

1. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, Drucker E, Bloom BR. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* 330: 1710-1716, 1994.
2. Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J Bacteriol* 178: 377-384, 1996.
3. Anthony RM, Schuitema AR, Bergval IL, Brown TJ, Oskam L, Klatser PR. 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* 4: 9, 2005.
4. Baptista IM, Oelemann MC, Opromolla DV, Suffys PN. 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* 97: 1147-1152, 2002.
5. Barlow RE, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH, Dickens A, Qamer S, Hawkey PM. 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* 39: 2453-2457, 2001.
6. Bauer J, Andersen AB, Kremer K, Miorner H. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol* 37: 2602-2606, 1999.
7. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuno L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Garcia de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Gutierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Mokrousov I, Narvaskaia O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofoa-Razanamparany V, Rasolonavalona T,

- Rossetti ML, Rusch-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6: 23, 2006.
8. Carricajo A, Vincent V, Berthelot P, Gery P, Aubert G. Mycobacterial cross-contamination of bronchoscope detected by molecular techniques. *J Hosp Infect* 42: 252-253, 1999.
  9. Chaves F, Dronda F, Alonso-Sanz M, Noriega AR. Evidence of exogenous reinfection and mixed infection with more than one strain of *Mycobacterium tuberculosis* among Spanish HIV-infected inmates. *Aids* 13: 615-620, 1999.
  10. Chevrel-Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R, Koubaji H, Gicquel B, Dellagi K. Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 31: 2446-2450, 1993.
  11. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, 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, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544, 1998.
  12. Collins DM, De Lisle GW. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol* 130: 1019-1021, 1984.
  13. Collins FM. Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Microbiol Rev* 2: 360-377, 1989.
  14. Cousins DV, Skuce RA, Kazwala RR, van Embden JD. 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* 2: 471-418, 1998.
  15. 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* 3: 722-731, 1999.
  16. Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 40: 1592-1602, 2002.
  17. Diaz R, Kremer K, de Haas PE, Gomez RI, Marrero A, Valdivia JA, van Embden JD, van Soolingen D. 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* 2: 743-750, 1998.
  18. Domenech P, Barry CE, 3rd, Cole ST. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Curr Opin Microbiol* 4: 28-34, 2001.
  19. Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, Williams J, Sordillo EM, Ong KR, Kilburn JO, Dooley SW, Castro KG, et al. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 326: 1514-1521, 1992.
  20. Espinal MA. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis (Edinb)* 83: 44-51, 2003.
  21. Fernando SL, Britton WJ. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunol Cell Biol* 84: 125-137, 2006.
  22. Frenay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, van Leeuwen W J., Mooi FR. Discrimination of epidemic and non-epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* 32: 846-847, 1994.
  23. Frothingham R. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by PCR. *J Clin Microbiol* 33: 2801-2802, 1995.
  24. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144: 1189-1196, 1998.
  25. Goguet de la Salmoniere YO, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, van Embden J, Gicquel B. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 35: 2210-2214, 1997.

26. Goyal M, Young D, Zhang Y, Jenkins PA, Shaw RJ. PCR amplification of variable sequence upstream of *katG* gene to subdivide strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 32: 3070-3071, 1994.
27. Goyal M, Saunders NA, van Embden JD, Young DB, Shaw RJ. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 35: 647-651, 1997.
28. Hill AV. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol* 16: 593-617, 1998.
29. Kamerbeek J, Schouls 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* 35: 907-914, 1997.
30. Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J Appl Microbiol* 94: 781-791, 2003.
31. Kato-Maeda M, Bifani PJ, Kreiswirth BN, Small PM. The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 107: 533-537, 2001.
32. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, Palittapongpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakus MA, Musser JM, van Embden JD. 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* 37: 2607-2618, 1999.
33. Lee AS, Tang LL, Lim I H, Bellamy R, Wong SY. Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high-resolution minisatellite-based typing. *J Clin Microbiol* 40: 657-659, 2002.
34. Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26: 2567-2582, 2005.
35. Lok KH, Benjamin WHJ, Kimerling ME, Pruitt V, Lathan M, Razeq J, Hooper N, Cronin W, Dunlap NE. Molecular differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains without IS6110 insertions. *Emerg Infect Dis* 8: 1310-1313, 2002.
36. Magdalena J, Supply P, Locht C. Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 36: 2471-2476, 1998.
37. Maguire H, Dale JW, McHugh TD, Butcher PD, Gillespie SH, Costetos A, Al-Ghusein H, Holland R, Dickens A, Marston L, Wilson P, Pitman R, Strachan D, Drobniewski FA, Banerjee DK. Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995-7 showing low rate of active transmission. *Thorax* 57: 617-622, 2002.
38. Mankiewicz E, Liivak M. Phage types of *Mycobacterium tuberculosis* in cultures isolated from Eskimo patients. *Am Rev Respir Dis* 111: 307-312, 1975.
39. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1901-1906, 2001.
40. McNabb SJ, Braden CR, Navin TR. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: lessons learned and implications for the future. *Emerg Infect Dis* 8: 1314-1319, 2002.
41. Mendiola MV, Martin C, Otal I, Gicquel B. Analysis of the regions responsible for IS6110 RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Res Microbiol* 143: 767-772, 1992.
42. Moro ML, Gori A, Errante I, Infuso A, Franzetti F, Sodano L, Iemoli E. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis involving HIV-infected patients of two hospitals in Milan, Italy. Italian Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak Study Group. *Aids* 12: 1095-1102, 1998.
43. Nardell EA. Tuberculosis in homeless, residential care facilities, prisons, nursing homes, and other close communities. *Semin Respir Infect* 4: 206-215, 1989.
44. Niemann S, Richter E, Dalugge-Tamm H, Schlesinger H, Graupner D, Konigstein B, Gurath G, Greinert U, Rusch-Gerdes S. Two cases of *Mycobacterium microti* derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. *Emerg Infect Dis* 6: 539-542, 2000.
45. Patel S, Wall S, Saunders NA. Heminested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 34: 1686-1690, 1996.

46. Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, Yang Z, Cave MD, Graviss EA. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol* 53: 107-113, 2004.
47. Reid SD, Hoe NP, Smoot LM, Musser JM. Group A *Streptococcus*: allelic variation, population genetics, and host-pathogen interactions. *J Clin Invest* 107: 393-399, 2001.
48. Ministério da Saúde - II Congresso Brasileiro de Tuberculose. *J Bras Pneumol* 30: 54-56, 2004.
49. Shamputa IC, Rigouts L, Eyongeta LA, El Aila NA, van Deun A, Salim AH, Willery E, Locht C, Supply P, Portaels F. Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 42: 5528-5536, 2004.
50. Skuce RA, Neill SD. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: exploiting molecular data. *Tuberculosis (Edinb)* 81: 169-175, 2001.
51. Suffys PN, Ivens de Araujo ME, Rossetti ML, Zahab A, Barroso EW, Barreto AM, Campos E, van Soolingen D, Kremer K, Heersma H, Degraeve WM. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res Microbiol* 151: 343-351, 2000.
52. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 36: 762-771, 2000.
53. Takahashi M. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* using by RFLP analysis between genomic DNA- its accomplishment and practice. *Kekkaku* 78: 641-651, 2003.
54. Torrea G, Offredo C, Simonet M, Gicquel B, Berche P, Pierre-Audigier C. Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 34: 1043-1049, 1996.
55. 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* 27: 315-334, 1983.
56. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31: 406-409, 1993.
57. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. 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* 29: 2578-2586, 1991.
58. van Soolingen D, Hermans PW. Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. *Eur Respir J* 20 (Suppl): 649s-656s, 1995.
59. Warren RM, Streicher EM, Charalambous S, Churchyard G, van der Spuy GD, Grant AD, van Helden PD, Victor TC. Use of spoligotyping for accurate classification of recurrent tuberculosis. *J Clin Microbiol* 40: 3851-3853, 2002.
60. 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* 36: 3385-3388, 1998.
61. Yang ZH, de Haas PE, Wachmann CH, van Soolingen D, van Embden JD, Andersen AB. Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992. *J Clin Microbiol* 33: 2077-2081, 1995.

## PRÓXIMOS EVENTOS NA ÁREA DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Campos do Jordão, SP, 11 a 15 de março de 2007. Informações: [www.sbmt.org.br](http://www.sbmt.org.br) ou [atendimento@perfectaeventos.com.br](mailto:atendimento@perfectaeventos.com.br)

II Conferencia Internacional sobre Giardia y Cryptosporidium, México, 13 a 18 de maio de 2007. Informações: <http://cinvestar.mx/giardiacrypto>

X Siconbiol Simpósio de Controle Biológico, Brasília, DF, 30 de junho a 04 de julho de 2007. Informações: <http://siconbiol.cenargen.embrapa.br>

4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Sidney, Australia, 22th to 25<sup>th</sup> July 2007. Informações: [www.ias2007.org](http://www.ias2007.org)

XX Encontro Brasileiro de Malacologia, Rio de Janeiro, 5 a 10 de agosto de 2007. Informações: [sbmalacologia@yahoo.com.br](mailto:sbmalacologia@yahoo.com.br)

13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, 21 a 25 de agosto de 2007. Informações: [www.immunorio2007.org.br](http://www.immunorio2007.org.br)

24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasília, DF, 3 a 6 de outubro de 2007. Informações: [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br)

XVIII Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología (FLAP), Isla de Margarita, Venezuela, 21 a 25 de outubro de 2007. Informações: [www.flap2007.com](http://www.flap2007.com)

XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, Recife, PE, 28 de outubro a 01 de novembro de 2007. Informações: [silferreira@icb.upe.br](mailto:silferreira@icb.upe.br)

5º. Congresso Brasileiro de Micologia, Recife, PE, 12 a 16 de novembro de 2007. Informações: [www.5micol.com](http://www.5micol.com)

VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical, Havana, Cuba, 4 a 7 de dezembro de 2007. Informações: [www.ipk.sid.cu/eventosipk/cong2007/](http://www.ipk.sid.cu/eventosipk/cong2007/)

44º. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Porto Alegre, RS, 4 a 8 de março de 2008. Informações: [www.sbmt.org.br](http://www.sbmt.org.br)