
ANÁLISE MOLECULAR DE
Mycobacterium tuberculosis **ISOLADOS DE PACIENTES**
ATENDIDOS EM GOIÂNIA, GOIÁS,
POR MEIO DO RFLP-IS6110 E DO 15 loci MIRU-VNTR

Alyne Melo Pereira¹, Lorena Cristina Santos^{1 e 2}, Hernane Bahia Fernandes¹, Sueli Lemes de Ávila Alves³, Ana Paula Junqueira-Kipnis¹ e André Kipnis¹

RESUMO

Atualmente, o controle da tuberculose é dependente de vários fatores tais como rápido diagnóstico, terapia adequada e meios de evitar futuras transmissões. Assim, a caracterização de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* por tipagem molecular por meio da técnica de RFLP-IS6110 representa uma contribuição primordial e tem sido amplamente utilizada nos estudos de genotipagem para que sejam traçadas cadeias de transmissão. No entanto, por causa da complexidade desta técnica e da dificuldade de interpretação dos dados, outras técnicas têm sido propostas. Entre elas, destaca-se o estudo do número variável de unidades repetitivas (MIRU-VNTR) indicado como novo padrão de genotipagem. O presente estudo teve como objetivo analisar as técnicas de RFLP-IS6110 e 15 loci MIRU-VNTR em isolados de pacientes atendidos no município de Goiânia, Goiás. Para isso, foram caracterizados geneticamente os isolados a fim de se estabelecerem possíveis ligações epidemiológicas entre os casos da doença. Também fez-se a comparação entre os resultados encontrados pelas duas técnicas e o cenário do Brasil. Os dados demonstraram que a técnica de 15 loci MIRU-VNTR discriminou mais os isolados que a técnica de RFLP-IS6110. Não foi encontrada associação epidemiológica entre os pacientes estudados. Os resultados validaram o uso da técnica 15 loci MIRU-VNTR para tipagem molecular de *M. tuberculosis* por apresentar maior poder discriminatório, boa eficiência para caracterizar geneticamente os isolados em Goiânia-GO, podendo, portanto, ser um método usado em estudo epidemiológico isolado ou em conjunto com outras técnicas.

DESCRITORES: Epidemiologia molecular; tuberculose; genotipagem; transmissão.

-
- 1 Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia. Universidade Federal de Goiás, Brasil.
 - 2 Departamento do Biomedicina, Faculdade Padrão, Goiás, Brasil.
 - 3 Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, Brasil.

Endereço para correspondência: André Kipnis, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Rua 235 esquina com a primeira avenida, s/n. Setor Universitário. CEP: 74605-050. Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: andre.kipnis@gmail.com

Recebido para publicação em: 12/2/2013. Revisto em: 31/7/2013. Aceito em: 7/8/2013.

ABSTRACT

Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in Goiânia, Brazil, using RFLP-IS6110 and 15 *loci* MIRU-VNTR techniques.

Currently, tuberculosis control is dependent on several factors, such as rapid diagnosis, appropriate therapy and measures to prevent future transmission. Thus, the characterization of strains of *Mycobacterium tuberculosis* by molecular typing using RFLP-IS6110, provides a major contribution, and has been widely used in genotyping studies in order to trace transmission pathways. However, due to the complexities of the technique and data interpretation, other techniques have been proposed. Among them, the study of the variable number of repeat units (MIRU-VNTR) has been indicated as a new standard method. This study aimed to apply and compare the RFLP-IS6110 and 15 *loci* MIRU-VNTR techniques for the analysis of isolates from tuberculosis patients treated in Goiânia, Brazil, in order to establish possible molecular epidemiological links between cases of the disease, and also to compare the results found by both techniques against the wider situation in Brazil. The results showed that 15 *loci* MIRU-VNTR discriminated between the isolates better than the RFLP-IS6110. No epidemiological link was observed among the patients studied. The results validate the use of the 15 *loci* MIRU-VNTR technique for molecular typing of *M. tuberculosis*, as it showed greater discriminatory power with good efficiency to genetically characterize the isolates in Goiânia, Goiás. This can be used in epidemiological studies alone or in conjunction with other molecular techniques.

KEY WORDS: Molecular epidemiology; tuberculosis; genotyping; transmission.

INTRODUÇÃO

Os métodos de tipagem molecular vêm desempenhando, atualmente, um importante papel na capacidade de discriminar isolados microbianos e, ao mesmo tempo, estabelecer uma relação clonal entre linhagens relacionadas. Constituem, assim, métodos úteis para estudos epidemiológicos que visam prevenir e bloquear cadeias de transmissão de diversas doenças infecciosas (10, 22). A aplicação desses métodos tem contribuído significativamente para uma maior compreensão dos casos e da transmissão da tuberculose em diversas regiões do mundo.

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que acomete, principalmente, o pulmão, por meio da inalação do bacilo, podendo afetar outros órgãos do corpo e adquirir um caráter disseminado. Apesar de ser uma das doenças mais antigas do mundo, de existir uma vacina mundialmente utilizada e tratamento eficaz (16), a TB continua sendo objeto de pesquisa. Esta doença merece uma atenção especial dos profissionais de saúde e da população em geral em razão de fatores como os movimentos populacionais que criam rotas de transmissão, a expansão da epidemia do HIV e o aumento da resistência às drogas.

Ao longo dos anos, vários métodos aplicáveis à epidemiologia molecular da TB foram desenvolvidos com base nas variações genéticas encontradas no genoma do *M. tuberculosis*. Esses métodos fornecem importantes informações sobre os mecanismos de transmissão da TB e associam linhagens com outros aspectos, como

virulência e resistência a drogas, os quais são fundamentais para auxiliar no controle da doença (22, 31), como faz a associação entre resistência a drogas e genótipos da família Beijing, que tem sido bem documentada por vários autores (1, 6, 12).

Dentre essas técnicas, a análise do polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição IS6110 (RFLP-IS6110), que se baseia nas diferenças de número e posição das sequências de inserção IS6110 encontradas dispersas no genoma do *M. tuberculosis*, é considerada “padrão-ouro” (29). Apesar disso, a técnica de RFLP-IS6110 apresenta algumas desvantagens por ser muito onerosa, necessitar de grandes quantidades de DNA, requerer o cultivo das micobactérias de crescimento lento e ter baixo poder discriminatório para isolados com pouco número de cópias de IS6110 (11). Por conseguinte, outras técnicas têm representado alternativas para análises de isolados de *M. tuberculosis*, como a tipagem baseada no número variável de repetições em *tandem* (VNTRs- *Variable Number of Tandem Repeats*) de unidades repetitivas intercaladas de micobactérias (MIRUs - *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*), especialmente nos casos em que a análise com a utilização de RFLP-IS6110 não é aplicável ou quando os resultados desta são de difícil interpretação (20).

O MIRU-VNTR utiliza a variabilidade na quantidade de repetições em *tandem* de MIRUs em diferentes *loci* no genoma das linhagens de *M. tuberculosis* (25, 30). A vantagem de MIRU-VNTR em comparação com a técnica padrão-ouro (RFLP-IS6110) diz respeito à facilidade de sua execução e análise e à maior rapidez, além da possibilidade de comparar os resultados obtidos com os de outros laboratórios do mundo graças à criação e manutenção de uma base de dados com os diferentes perfis (30).

Em estudo, Radhakrishnan et al. (2001) analisaram, por meio de RFLP-IS6110, isolados em um estado no sul da Índia onde a TB é endêmica. Observaram que a maioria dos isolados apresentava poucas ou nenhuma cópia de IS6110, o que inviabilizou a aplicação desta técnica como único método de tipagem. Varma-Basil et al. (2011) realizaram outro estudo em Delhi, no norte da Índia, país com elevada incidência de TB, e validaram o uso de MIRU-VNTR para tipagem molecular de *M. tuberculosis* em 101 isolados e ressaltaram a utilidade desta técnica para discriminar amostras com baixo número de cópias de IS6110, já que representaram mais de um quinto das cepas analisadas.

Segundo um consenso da União Europeia sobre a determinação de novos marcadores e técnicas para epidemiologia e controle da TB, o método de tipagem MIRU-VNTR poderá substituir o RFLP-IS6110 em um futuro próximo (20). Estudo realizado por Supply et al. (2006), analisando isolados de várias partes do mundo, auxiliou na caracterização de MIRUs em vários *loci* e permitiu padronizar um conjunto de 24 *loci* MIRU-VNTR, incluindo um subconjunto de 15 *loci* muito discriminatórios, para serem usados como um método de tipagem de primeira linha. Este conjunto de *locus* demonstrou uma confiável melhora na discriminação de isolados de *M. tuberculosis*.

Até o momento, estudos sobre a aplicação de métodos de tipagem em isolados de *M. tuberculosis* atendidos na cidade de Goiânia são escassos e a aplicação da técnica de MIRU-VNTR ainda não foi avaliada. O objetivo deste estudo foi utilizar as técnicas RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR em isolados de pacientes atendidos no município de Goiânia-GO para que fossem observados os focos de TB e estabelecidas prováveis ligações epidemiológicas entre os casos da doença, identificando possíveis cadeias de transmissão e discriminando os isolados. Pretendeu-se, também, validar a técnica de 15 loci MIRU-VNTR como método alternativo à técnica padrão-ouro RFLP-IS6110. Adicionalmente, foram comparados os resultados encontrados neste cenário com os de outros locais do Brasil. Desse modo, será possível, futuramente, traçar um perfil específico das cepas circulantes e estudar métodos mais adequados e com bons resultados para a interrupção de focos de transmissão da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal de genotipagem molecular de isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

Recrutamento dos casos

Para o estudo foram utilizadas 107 amostras de escarro de pacientes suspeitos de TB pulmonar, atendidos no período de janeiro de 2006 a junho de 2007 no Hospital de Doenças Tropicais (HDT) Anuar Auad e no Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica de Goiânia. Esses dois locais são referência em doenças infecciosas e recebem pacientes de várias localidades, inclusive de outras regiões do país. Assim, dentre as amostras coletadas, 52 tratava-se de pacientes residentes da cidade de Goiânia, 43 de outras cidades do estado de Goiás e 12 amostras eram de outros estados brasileiros, sendo dois pacientes da Bahia (amostras 152 e CR15_2), dois de Minas Gerais (amostras 59 e 138), três de Mato Grosso (amostras 121, 130 e 70) e um paciente de cada um dos seguintes estados: Tocantins (amostra 2), Piauí (amostra 49), São Paulo (amostra 147), Paraíba (amostra 89) e Maranhão (amostra 142).

Não houve discriminação quanto à raça, sexo, idade, nem quanto ao tipo de TB (primária ou recorrente). Todos os participantes foram entrevistados e as variáveis investigadas foram idade, sexo, cicatriz vacinal de BCG e fatores predisponentes para TB. As coletas das amostras foram realizadas de acordo com as diretrizes e normas para a pesquisa com seres humanos, após assinatura pelos pacientes e/ou seus responsáveis do termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (UFG nº 006/2005).

Isolamento de *M. tuberculosis*

As amostras de escarro foram processadas pelo método modificado de Corper & Stoner (1946), seguido pela cultura em meio Lowesntein-Jensen (LJ)

conforme as recomendações do Programa Nacional de Controle da Tuberculose. O agente etiológico foi identificado de acordo com tempo de crescimento, morfologia das colônias e provas bioquímicas (14).

As culturas de *M. tuberculosis* em meio LJ foram inativadas a 80°C e utilizadas para extração de DNA segundo o protocolo de van Soolingen et al. (1994) e posterior genotipagem pelos métodos de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR.

Análise de RFLP-IS6110

Dois microgramas do DNA micobacteriano foram digeridos com 10U da enzima de restrição *PvuII* no tampão apropriado, em um volume de 20µL, por três horas a 37°C. Após corrida de gel de agarose a 1%, procedeu-se à desnaturação do gel e transferência por capilaridade do DNA para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram hibridizadas com uma sonda para IS6110 de acordo com a metodologia padronizada por van Embden et al. (1993) e os padrões de bandas analisados no programa BioNumerics versão 4.0 do Windows (Applied Maths), utilizando-se coeficiente de similaridade de Dice e algoritmo UPGMA (Unweigghted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), com otimização e tolerância de posição de bandas de 1,5%. Para análise final dos perfis de bandas e determinação de similaridades entre as amostras, utilizou-se o programa BioNumerics versão 4.0 do Windows (Applied Maths). O DNA da cepa de referência *M. tuberculosis* MT14323 (Gentilmente cedida pelo Dr. Philip N. Suffys, FIOCRUZ, RJ, Brazil) foi usado em todos os géis como normalizador interno.

Análise de MIRU-VNTR

Foram realizadas PCR específicas para os 15 *loci* MIRU-VNTR que possuem um bom poder discriminatório segundo Supply et al. (2006). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídeo, submetido à eletroforese com 80V durante um período de sete horas juntamente com um marcador de 100pb de DNA (Invitrogen) para fins de comparação. O tamanho dos produtos de cada amostra foi determinado com auxílio do *software* Quantity One 4.6.7 (BioRad) e, conseqüentemente, o número de cópias correspondente aos *loci* foi inferido de acordo com a tabela descrita por Supply (2005). O DNA da cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv foi utilizado como normalizador interno e o controle negativo da reação consistiu de água ultrapura no lugar do DNA.

O dendrograma (gerado nas análises UPGMA) e a comparação do perfil das amostras foram produzidos no endereço eletrônico www.miru-vntrplus.org (33). A diversidade alélica (h), que analisa a variação dos diferentes alelos encontrados para um mesmo *locus* dentro das amostras, foi calculada usando-se a fórmula: $h = 1 - \sum x_i^2$, na qual x_i é a frequência de cada alelo para um determinado *locus* (24). De acordo com h , os *loci* foram classificados como *altamente*

discriminante ($h > 0,6$), *moderadamente discriminante* ($0,3 \leq h \leq 0,6$) e *pouco discriminante* ($h < 0,3$) (23).

O poder discriminatório descrito por Hunter & Gaston (1988) foi utilizado para determinar se o método de tipagem molecular foi capaz de distinguir duas amostras selecionadas randomicamente de uma população. Para esse cálculo, foi usada a fórmula disponível no endereço eletrônico http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/, que se baseia no número total de isolados avaliados por um determinado método de tipagem molecular, no número de diferentes padrões de MIRU-VNTRs e no número de isolados contidos em cada padrão. Por este método, calcula-se o valor de D, que é o índice do poder discriminatório e pode variar de 0 a 1; neste caso, 0 significa que todos os isolados de uma determinada população possuem tipos idênticos, ao passo que D igual a 1 indicaria que o método de tipagem foi capaz de distinguir cada isolado de uma determinada população de todos os demais.

Os *clusters* foram verificados visualmente para coerência e os agrupamentos definidos quando a similaridade entre os isolados foi de 100%. A taxa de *clusters* foi calculada de acordo com a equação descrita por Bidovec-Stojkovic et al. (2011): $T = (n_c - c)/n$, em que n_c é o número total de amostras agrupadas, c é o número de agrupamentos encontrados e n é o número total de casos na amostra.

RESULTADOS

Foram recrutados 107 pacientes atendidos no período de janeiro de 2006 a junho de 2007 oriundos de diversas localidades. Apesar de a maioria desses pacientes ser constituída de residentes em Goiânia (48,6%), vários deles residiam em outros municípios de Goiás (40,1%) e alguns em outros estados brasileiros (11,2%). Entre todos eles houve predominância de pacientes do sexo masculino (82,2%), economicamente ativos e com uma média de idade de 33 anos. Foram encontrados 82 pacientes (76,6%) com TB primária e 25 (23,4%) com TB recorrente; 64 pacientes (69,1%) tinham fatores predisponentes ao desenvolvimento da TB, como tabagismo, alcoolismo e coinfeção com HIV.

As análises das amostras por meio dos métodos de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR permitiram que fossem gerados dendrogramas pelo programa Bionumerics e pelo endereço eletrônico MIRU-VNTR*plus*, respectivamente. A técnica 15 *loci* MIRU-VNTR identificou 101 perfis diferentes, em que 97 (90,6%) amostras apresentaram perfis únicos e 10 (9,34%) agruparam-se em quatro *clusters* distintos. A taxa de *clusters* para essa técnica foi de 5,6%, enquanto a técnica de RFLP-IS6110 discriminou 80 perfis totais, sendo 58 (54,3%) amostras com perfis únicos e 49 (45,7%) agrupadas em 22 *clusters*. A taxa de *clusters* resultante da análise por RFLP-IS6110 foi de 25,2% (Figura 1). Sete amostras não amplificaram em alguns *loci* mesmo após repetidas tentativas.

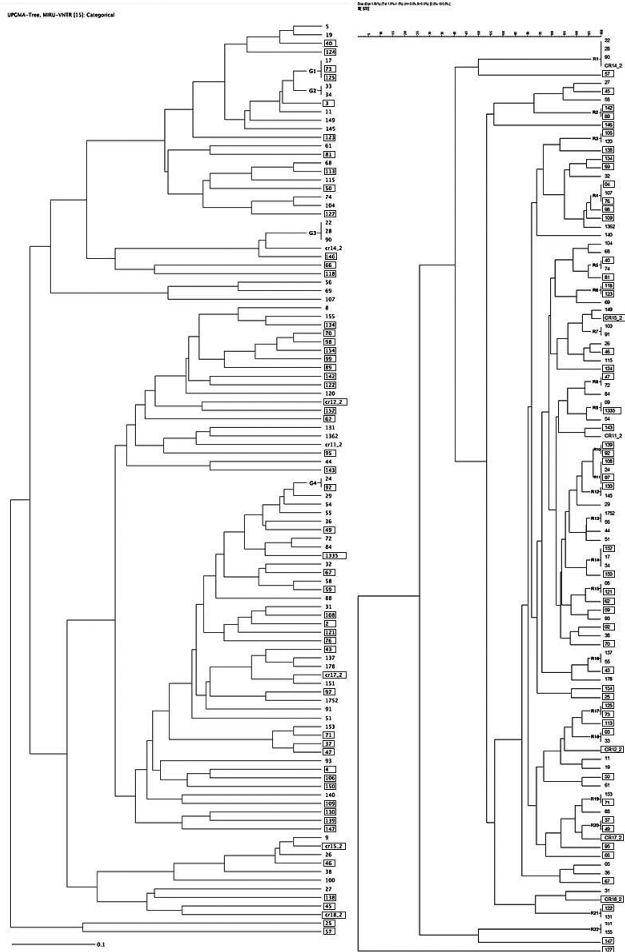


Figura 1. Análise molecular dos 107 isolados incluídos no estudo. Em A, o dendrograma gerado a partir da técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR mostra *clusters* que estão indicados pela letra G. Em B, o dendrograma gerado pela técnica de RFLP-IS6110 cujos *clusters* estão identificados com a letra R. Os números à esquerda dos dendrogramas representam a identificação das amostras (II). Amostras coletadas no Centro de Referência são precedidas com as letras CR. As identificações dentro de quadros representam amostras isoladas de pacientes oriundos de fora de Goiânia. O dendrograma (I) foi construído com o coeficiente de similaridade Dice e o algoritmo UPGMA usando a tolerância de uma posição de 1,5%.

Um total de 44 amostras agrupadas pela técnica de RFLP-IS6110 (designadas por números precedidos da letra R na Figura 1) foi diferenciado pela técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR. Quatro amostras agrupadas em dois grupos distintos pela técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR (G2 e G4, designados por números precedidos da letra G na Figura 1) apresentaram-se agrupadas com outras amostras pela técnica de RFLP-IS6110 (grupos R10, R11, R14 e R18, respectivamente). As amostras 22, 28 e 90 mostraram-se igualmente agrupadas por ambas as técnicas (agrupamentos R1 e G3). Da mesma forma, as amostras 73 e 125 permaneceram também agrupadas nas análises por ambas as técnicas (grupos R17 e G1).

Dentre as amostras agrupadas em *clusters* não foi possível estabelecer qualquer tipo de ligação epidemiológica entre cada agrupamento. Em apenas um caso (amostra 22) tratava-se de TB anterior. A maioria desses pacientes agrupados (71,4%) apresentava fatores predisponentes para o desenvolvimento da doença, como tabagismo e HIV, e um paciente usava drogas ilícitas.

A comparação entre as técnicas demonstrou que a técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR discriminou mais os isolados que a técnica de RFLP-IS6110, agrupando apenas 9,34% das amostras, portanto apresentou maior poder discriminatório (Tabela 1).

Tabela 1. Número de perfis encontrados, agrupamentos e poder discriminatório dos métodos usados no estudo.

Método	Total de perfis	Total de perfis únicos	Total de perfis agrupados	Poder Discriminatório
15 <i>loci</i> MIRU-VNTR	101	97	4	0,9986
RFLP-IS6110	80	58	22	0,9942

Os valores da diversidade alélica nas amostras analisadas foram calculados para cada *locus* e estão apresentados na Tabela 2. Os MIRU-VNTRs – QUB26, Miru 40, Mtub 04, QUB11b e Mtub 21 – apresentaram elevado poder discriminatório, sendo o Miru 40 o mais polimórfico com dez alelos. Todos os demais *loci* apresentaram moderado poder discriminatório.

De acordo com os perfis apresentados pela técnica de RFLP-IS6110, o número de cópias de IS6110 das amostras variou entre 1 e 14 repetições e a maioria dos isolados tinha entre seis e nove cópias (dados não mostrados).

Após a comparação dos perfis das amostras estudadas com os perfis das amostras presentes no banco de dados na plataforma MIRU-VNTR_{plus}, a maioria dos isolados (83,2%) possuía padrões de MIRU-VNTR sem semelhança com os isolados caracterizados no banco de dados, enquanto 13% dos genótipos analisados neste estudo foram similares ao de cepas LAM e quatro isolados (3,8%) apresentaram similaridade com cepas Haarlem.

Tabela 2. Diversidade alélica de cada *locus* e número de ocorrência de cada alelo.

<i>Locus</i>	Diversidade Alélica (h)	Número de Alelos	Número de Repetições	Discriminação ^a
QUB 26	0,78	8	3-10	Alta
Miru 40	0,77	10	1-10	Alta
Mtub 04	0,70	5	0-4	Alta
QUB 11b	0,67	8	1-7;11	Alta
Mtub 21	0,65	7	1-7	Alta
Mtub 39	0,59	9	1-6;8-10	Moderada
Mtub 30	0,58	4	1-2;4-5	Moderada
ETRC	0,57	6	2-7	Moderada
Miru 10	0,56	5	2-6	Moderada
Miru 26	0,54	7	1-7	Moderada
ETRA	0,53	4	1-3;6	Moderada
Miru 31	0,52	4	1-3;5	Moderada
QUB4156	0,39	5	1-5	Moderada
Miru 16	0,38	4	1-4	Moderada
Miru 04	0,31	6	1-3;3s;5-6	Moderada

a. A discriminação é definida de acordo com a diversidade alélica (h) como: Alta ($h > 0,6$), Moderada ($0,3 \leq h \leq 0,6$) e Pouca ($h < 0,3$) (23).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente estudo aplicou as técnicas de 15 *loci* MIRU-VNTR e RFLP-IS6110 em amostras de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em Goiânia e observou-se que a primeira técnica foi mais discriminatória que a técnica padrão-ouro (RFLP-IS6110) nestas amostras, sendo este estudo pioneiro em relação aos isolados da região.

O desenvolvimento e a aplicação da técnica de MIRU-VNTR em isolados de *M. tuberculosis* se tornou uma importante conquista metodológica para uma melhor compreensão da epidemiologia molecular da TB (30). A importância de se trabalhar com técnicas mais ágeis, com menor custo e bons resultados está relacionada ao aumento das chances de cura, às melhorias no controle e à vigilância da doença. A análise molecular dos 107 pacientes incluídos neste estudo pelo método de 15 *loci* MIRU-VNTR agrupou 9,3% das amostras estudadas, as demais apresentaram perfis únicos, enquanto a técnica de RFLP-IS6110 agrupou 45,7%. Com base nas análises, pode-se afirmar que o poder discriminatório da técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR foi de 0,9986, considerado satisfatório. Isso demonstra que a técnica possui boa capacidade para discriminar isolados e distingue os agrupamentos de cepas mais semelhantes. Esses dados corroboram os achados de outros estudos segundo os quais as análises baseadas em 15 *loci* resultam em boa eficiência para estudos epidemiológicos, representando 96% dos resultados gerados quando se usam todos os 24 *loci* (27,2,19).

A Região Centro-Oeste apresenta uma das menores taxas de incidência de casos de TB do Brasil (17) e, embora o número de isolados incluídos neste

estudo tenha sido pequeno, ele representa uma porcentagem significativa dos casos diagnosticados em Goiânia no período de estudo (média de 229 diagnósticos por ano, de acordo com a Secretaria Municipal de Saúde). Outros estudos também empregaram essas técnicas moleculares utilizando números limitados de amostras (3, 11, 13). Em pesquisa desenvolvida por Vadwai et al. (2012) em Mumbai, Índia, região com elevada incidência de TB, a técnica de 24 *loci* MIRU-VNTR não identificou nenhum agrupamento entre os 69 isolados analisados, obtendo um poder de discriminação de 1,0 que é bastante satisfatório. Por sua vez, a técnica de RFLP apresentou um poder de discriminação um pouco menor (0,998) agrupando três amostras em um *cluster*, além de apresentar isolados com baixo número de cópias de IS6110.

Segundo alguns estudos (7, 8, 28), o aparecimento de cepas de *M. tuberculosis* pertencentes a um grupo genético idêntico sugere transmissão recente da doença. Já os isolados de pacientes pertencentes a grupos genéticos únicos sugerem doença proveniente de reativação de uma infecção latente adquirida no passado. De acordo com resultados obtidos a partir da técnica 15 *loci* MIRU-VNTR, não foi possível traçar cadeias de transmissão entre as amostras, o que sugere que estas não são focos recentes de transmissão da doença, ou seja, são eventos independentes, sem relações epidemiológicas entre os pacientes. Contudo, apesar de o número de casos estudados corresponder à maioria das ocorrências de TB diagnosticadas em Goiânia, algumas cadeias de transmissão podem não ter sido detectadas, visto que não se conseguiu a inclusão de todos os casos incidentes na cidade durante o período do estudo.

A genotipagem de isolados possibilita traçar relações epidemiológicas na transmissão de doenças infecciosas. Cadeias de transmissão de TB, geralmente são originadas da convivência entre os pacientes e pessoas próximas, seja por algum grau de parentesco, local de residência, trabalho, etc. (15). Dessa forma, outro fator que pode estar associado ao baixo número de agrupamentos observados é o fato de muitos pacientes serem provenientes de outras cidades e não somente de Goiânia (55 pacientes de um total de 107). Estes pacientes apresentaram perfis únicos e entre os casos agrupados apenas os *clusters* G2 e G3 (Figura 1) pertenciam a pacientes residentes na mesma cidade (Goiânia), porém não foram detectados vínculos sociais entre eles, corroborando a ideia de que não havia relação epidemiológica.

Dentre as amostras procedentes de outros estados, todas apresentaram perfis genéticos únicos, não tendo, assim, vínculos de transmissão da doença entre os demais pacientes estudados no período. Todavia é necessário um estudo abrangendo os anos seguintes para que se possa conhecer possíveis vínculos de transmissão, pois, com a migração desses pacientes para tratamento em Goiânia, é possível supor a entrada de novas linhagens no estado, assim como a introdução de novas cepas resistentes na região.

Como a maioria dos isolados apresentou perfis genotípicos únicos, com base nos resultados da técnica mais discriminatória 15 *loci* MIRU VNTR, houve

contradição com o resultado apresentado pela técnica de RFLP-IS6110, que sugeriu pequenos surtos entre os pacientes envolvendo diferentes cepas de *M. tuberculosis* em razão da existência de pequenos agrupamentos encontrados. A inexistência de associação para explicar os *clusters* observados pôde ser esclarecida com a análise pela técnica de MIRU-VNTR, que mostrou que os agrupamentos feitos pela técnica RFLP-IS6110 não persistiram após análise com uma técnica mais discriminatória.

Neste estudo, o valor da diversidade alélica apresentado pelas amostras isoladas variou consideravelmente entre alguns *loci*. O *locus* com maior poder discriminatório foi o QUB26, que apresentou uma diversidade alélica de 0,78. Outros quatro *loci* também apresentaram alto poder discriminatório (>0.6): Miru 40 (0,77), Mtub 04 (0,70), QUB 11b (0,67) e Mtub 21 (0,65). Esses *loci* também apresentaram elevado poder discriminatório em estudo de Supply et al. (2006) com isolados de várias regiões do mundo e de Bidovec-Stojkovic et al. (2011) com isolados da Eslovênia.

Alguns isolados se mostraram próximos às famílias LAM e Haarlem (13% e 3,8% dos isolados, respectivamente). A predominância de cepas de *M. tuberculosis* pertencentes à linhagem LAM também foi observada em diversos estudos realizados no Brasil com cepas circulantes no país, como o estudo de Oelemann et al. (2011), no qual foram encontradas cepas da linhagem LAM em 66,7% do total de 361 amostras de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes do Rio de Janeiro, Belém e Porto Alegre. Também, em estudo realizado em Maringá-PR por Noguti et al. (2010), 25 isolados (26,8%) dos 93 estudados foram classificados como de linhagem LAM.

A predominância da linhagem LAM no Brasil pode ser explicada pela influência da imigração, principalmente vinda do sul da Europa e África, onde estas cepas se apresentam com disseminação generalizada (4, 19). A frequência da linhagem LAM encontrada neste estudo é bem menor do que a descrita pelos outros autores, porém nenhum desses estudos incluiu isolados da Região Centro-Oeste, sendo escassas no Brasil publicações que avaliam a frequência de linhagens existentes nesta região do país.

Apesar de a linhagem LAM predominar entre as cepas identificadas dentro de famílias conhecidas, a maioria dos isolados (83,2%) deste estudo apresentaram perfis desconhecidos, indicando a grande diversidade genética dos isolados de *M. tuberculosis* existente na região Central do país, que pode ser resultado de uma grande mistura étnica entre os habitantes.

Neste estudo, foram encontradas poucas dificuldades durante a realização da técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR. Algumas amostras apresentaram diversas bandas de amplificação para um mesmo *locus*. Nesses casos, o PCR foi repetido com o acréscimo de 5% (1,5µL) de dimethyl sulfoxide (DMSO) à quantidade final da reação para aumentar a especificidade, o rendimento e a consistência. Os produtos da nova amplificação apresentaram bandas únicas para o *locus* específico em todos esses casos. Sete amostras não produziram nenhuma amplificação em

alguns *loci*. Segundo Supply et al. (2006), nestes casos os genótipos ainda podem ser comparados de forma confiável com base na caracterização dos 14 *loci* restantes.

O estudo conclui que a técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR apresentou maior poder discriminatório que a técnica de RFLP-IS6110, boa eficiência para caracterizar geneticamente os *M. tuberculosis* isolados em Goiânia-GO, portanto pode ser um método usado em estudo epidemiológico sozinho ou em conjunto com outras técnicas.

Os isolados analisados sugerem ausência de transmissão recente da TB em Goiás e também na cidade de Goiânia, capital do estado, uma vez que a maioria das amostras apresentou perfis únicos, demonstrando elevada diversidade genética de cepas circulantes.

AGRADECIMENTOS

Expressamos nossos agradecimentos ao CNPq, órgão financiador, conforme os processos nº 477285/2004-0 e nº 569257/2008-5.

REFERÊNCIAS

1. Almeida D, Rodrigues C, Ashavid TF, Lalvani A, Udwardia ZF, Mehta A. High incidence of the *Beijing* genotype among multi-drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in a tertiary care centre in Mumbai, Índia. *Clin Infect Dis* 40: 881-886, 2005.
2. Alonso-Rodriguez N, Martinez-Lirola M, Herranz M, Sanchez-Benitez M, Barroso P, Bouza E, Garcia de Viedma D. Evaluation of the new advanced 15-*loci* MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiol* 8: 34, 2008.
3. Bidovec-Stojkovic U, Zolnir-Dovca M, Supply P. One year nationwide evaluation of 24-*locus* MIRU-VNTR genotyping on Slovenian *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Respiratory Medicine* 105 S1: S67-S73, 2011.
4. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix-Beguec 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, Gazzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Gutierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadiival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Mokrousov I, Narvskaia O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofo-Razanamparany V, Rasolonalona 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: 6-23, 2006.
5. Corper HJ, Stoner RE. An improved procedure for the diagnostic culture of mammalian tubercle bacilli. *J Lab Clin Med* 31: 1364-1371, 1946.
6. Cox HS, Kubica T, Doshetov D, Kebede Y, Rusch-Gerdes S, Niemann S. The *Beijing* genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia. *Respir Res* 6: 134, 2005.
7. Dale JW, Nor RM, Ramayah S, Tang TH, Zainuddin ZF. Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia. *J Clin Microbiol* 37: 1265-1268, 1999.
8. Ferrazoli L, Palaci M, Marques LR, Jamal LF, Afiune JB, Chimara E, Martins MC, Silva Telles MA, Oliveira CA, Palhares MC, Spada DT, Riley LW. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 18-25, 2000.

9. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26: 2465-2466, 1988.
10. Jagielski T, Augustynowicz-Kopec E, Pawlik K, Dziadek J, Zwolska Z, Bielecki J. A two-step strategy for molecular typing of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *Pol J Microbiol* 60: 233-241, 2011.
11. 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.
12. Marais BJ, Victor TC, Hesselning AC, Barnard M, Jordaan A, Brittle W, Reuter H, Beyers N, van Helden PD, Warren RM, Schaaf S. *Beijing* and *Haarlem* genotypes are overrepresented among children with drug-resistance tuberculosis in the western cape province of South Africa. *J Clin Microbiol* 44:3539-3543, 2006.
13. 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.
14. Ministério da Saúde. Manual de Bacteriologia da Tuberculose, 3rd ed. Funasa. Rio de Janeiro, 2005.
15. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_tuberculose.pdf
16. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde. Brasília, 2011.
17. Ministério da Saúde. Série histórica da Taxa de Incidência de Tuberculose. Brasil, Regiões e Unidades Federadas de residência por ano de diagnóstico (1990 a 2012), 2013. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Mar/25/taxa_incidencia_tuberculose_1990_2012_base_22_02_2013.pdf
18. Noguti EN, Leite CQ, Malaspina AC, Santos AC, Hirata RD, Hirata MH, Mamizuka EM, Cardoso RF. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Paraná in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 779-785, 2010.
19. Oelemann MC, Gomes HM, Willery E, Possuelo L, Batista Lima KV, Allix-Beguec C, Locht C, Goguet de la Salmoniere YO, Gutierrez MC, Suffys P, Supply P. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain lineage from a high tuberculosis burden country. *PLoS One* 6: e18256, 2011.
20. Pandolfi JR, Malaspina AC, Santos ACB, Suffys PN, Oelemann, MAC, Valentini SR, Leite CQF. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 28: 251-257, 2007.
21. Radhakrishnan I, Manju YK, Kumar RA, Mundayoor S. Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India. *J Clin Microbiol* 39: 1683, 2001.
22. Santos LC, Junqueira-Kipnis A, Kipnis A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Rev Patol Trop* 36: 1-15, 2007.
23. Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, Rastogi N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* 3: 125-133, 2003.
24. Sun YJ, Lee ASG, Sze TN, Ravindran S, Kremer K, Bellamy R, Wong SY, van Soo D. Characterization of Ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by Multiple Genetic Markers and Proposal of Genotyping Strategy. *J Clin Microbiol* 42: 5058-5064, 2004.
25. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 39: 3563-3571, 2001.

26. Supply P. Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Technical Guide, Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille, 2005. Available from: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU-VNTRtypingmanualv6.pdf>.
27. Supply P, Allix-Beguec C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Loch C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44: 4498-4510, 2006.
28. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. 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. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18: 426-439, 1997.
29. Valcheva V, Mokrousov I, Narvskaya O, Rastogi N, Markova N. Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria. *J Clin Microbiol* 46: 3005-3011, 2008.
30. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31: 406-409, 1993.
31. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* 235: 196-205, 1994.
32. Varma-Basil M, Kumar S, Arora J, Angrup A, Zozio T, Banavaliker JN, Singh UB, Rastogi N, Bose M. Comparison of spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive units typing and IS6110-RFLP in a study of genotypic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Delhi, North India. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 524-535, 2011.
33. Weniger T, Harmsen D, Supply P, Niemann S. Mycobacteria MIRU-VNTRplus: online database and analysis tool for MIRU, SPOLIGO, and regions of difference data. In: 107th General Meeting, American Society for Microbiology, Toronto: Canada; 2007. Disponivel em: <http://www.miru-vntrplus.org/>.