

Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia

Pandolfi, J.R.^{1,2}; Malaspina, A.C.¹; Santos, A.C.B.¹; Suffys, P.N.³; Oellemann, M.A.C.³; Valentini, S.R.¹; Leite, C.Q.F.^{1*}

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

²Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Camilo Castelo Branco, UNICASTELO, Descalvado, SP, Brasil.

³Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Tuberculose, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido 27/11/2007 / Aceito 28/02/2008

RESUMO

A existência de sistemas que possam diferenciar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* epidemiologicamente relacionadas daquelas não relacionadas, são ferramentas importantes. A tuberculose é uma doença infecciosa, na qual técnicas de biologia molecular permitem a obtenção de informações muito difíceis ou impossíveis de serem alcançadas pela epidemiologia clássica. Um método de tipagem discriminatório, baseado no DNA genômico bacteriano, denominado RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), é empregado no estudo epidemiológico da tuberculose. Entretanto esta técnica é trabalhosa e sua substituição é uma tendência. Assim, outras seqüências têm sido usadas como marcadores epidemiológicos, como na *Spoligotyping*, a qual é baseada na PCR, com hibridização diferencial subsequente dos produtos amplificados. O polimorfismo observado nas diferentes amostras é provavelmente produto de recombinação homóloga. A técnica de MIRU (mycobacterial interspersed repetitive unit) é um sistema rápido e reprodutível, onde ocorre a geração de genótipos baseados no estudo de 12 loci contendo VNTRs (número variável de repetições em seqüência) do complexo *M. tuberculosis*. Ela compara as cepas de áreas geográficas diferentes e permite o rastreamento do movimento de linhagens individuais, como no RFLP. Este tipo de abordagem permite a análise de maior número de cepas e a identificação de um número maior de focos de contaminação dentro da população, propiciando melhores maneiras de frear a transmissão da doença.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculose; epidemiologia molecular; genotipagem.

INTRODUÇÃO

A tuberculose, doença infecto-contagiosa, acomete o homem há milênios, como demonstram os esqueletos fósseis de seres humanos com lesões ósseas compatíveis com essa enfermidade encontrados em várias regiões e datados até de cinco mil anos a.C. (Marques & Cunha, 2003). Com os movi-

mentos migratórios e com as grandes guerras, a doença espalhou-se pelo mundo.

A tuberculose é uma doença crônica, causada pelo complexo *M. tuberculosis* e sua forma clínica é caracterizada principalmente pelo comprometimento dos pulmões (pulmonar), podendo também atingir outros sítios anatômicos (extrapulmonar) ou ocorrer de maneira disseminada (disseminada ou miliar).

As espécies do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. caprae*) pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único representante da família *Mycobacteriaceae* e os membros deste complexo se apresentam em forma de bacilos curvos ou retos de 0,2 a 0,7 µm de largura e 1,0 a 3,0 µm de comprimento. Possuem a propriedade de álcool-ácido resistência devido ao alto conteúdo lipídico de sua parede celular (cerca de 60% de seu peso seco) que contém ácidos graxos de cadeia longa (75 a 90 carbonos) denominados ácidos micólicos (Sherris, 1984; Sato, 1999; Strohl et al., 2004). São organismos aeróbios, não esporulados e de crescimento lento, ou seja, requerem mais de sete dias para produzir colônias visíveis em meios de cultura sólidos, pois a natureza hidrofóbica de sua superfície celular leva à formação de aglomerados e a alterações na permeabilidade dos nutrientes através da célula (Sherris, 1984; Sato, 1999; Strohl et al., 2004).

A tuberculose é transmitida de pessoa a pessoa por via aérea, através de gotículas de 1,0 a 5,0 µm de diâmetro produzidas pelo indivíduo portador da forma clínica pulmonar ou laríngea da doença, ao tossir, espirrar ou falar (Edwards & Kirkpatrick, 1986). Após a inalação, as gotículas, que geralmente contêm de um a dois organismos, são levadas até a árvore brônquica e atingem os alvéolos, local onde os bacilos iniciarão o processo patológico da doença, se conseguirem sobreviver às defesas primárias e se multiplicarem dentro do macrófago alveolar (Edwards & Kirkpatrick, 1986; Horsburgh, 1996).

A patogenicidade do *M. tuberculosis* depende de sua capacidade de sobreviver e crescer dentro das células do hospedeiro. O bacilo não produz toxinas demonstráveis, porém, quando envolvido pelos macrófagos, inibe a fusão das vesículas fagocíticas com os lisossomos através dos

*Autor Correspondente: Clarice Queico Fujimura Leite - Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, UNESP - Rodovia Araraquara-Jaú, km 01 - CEP: 14801-902 - Araraquara - SP, Brasil - e-mail: leitecqf@fctfar.unesp.br

sulfolipídeos (Strohl et al., 2004).

O crescimento da bactéria é lento, ocorrendo aproximadamente uma divisão a cada intervalo de 25 a 32 horas dentro do macrófago. Os organismos se multiplicam por um período de duas a doze semanas até atingirem o número de 10^3 a 10^4 células, quantidade suficiente para induzir uma resposta imune-celular que poderá ser detectada pela reação do teste tuberculínico (PPD) (Smith & Wiengeshaus, 1989). Muitas vezes um resultado de PPD positivo é a única indicação de que a infecção com o *M. tuberculosis* tenha ocorrido.

O *M. tuberculosis* estimula tanto as respostas imunes humorais como as celulares, embora os anticorpos circulantes não forneçam resistência ao organismo. A imunidade celular e a hipersensibilidade tardia aos antígenos protéicos do bacilo se desenvolvem durante o curso da infecção e contribuem para a patologia e a imunidade da doença (Sherris, 1984; Strohl et al., 2004).

Indivíduos com infecção latente, ou seja, que não apresentam a doença em sua forma ativa, não podem transmitir os bacilos. Estima-se que cerca de 10% das pessoas que adquirem a infecção e não recebem a terapia preventiva irão desenvolver a doença; nos 90% restantes, a infecção permanecerá latente ou será eliminada pelas defesas do organismo. O risco é maior nos primeiros dois anos após a infecção, período em que a manifestação da doença é observada em 50% dos casos (Bloom, 1994). Por outro lado, os bacilos podem permanecer vivos no interior dos granulomas durante toda a vida do indivíduo, reativando-se diante de condições favoráveis ao seu desenvolvimento conforme dados de nossos estudos (Leite & Telarolli Júnior, 1997).

Portanto, a tuberculose pode resultar de uma infecção exógena (infecção recente), causada pelo contágio com um paciente bacilífero, ou de uma infecção endógena (reativação), quando ocorre a recrudescência da infecção primária.

O indivíduo portador pode sofrer uma redução de sua capacidade em responder à infecção sob algumas condições. Entre elas estão o uso de corticóides e outras drogas imunossupressoras e o desenvolvimento de certas doenças como diabetes *mellitus* e a infecção pelo vírus HIV. Nestas situações, se o indivíduo for infectado pelo *M. tuberculosis*, a probabilidade do desenvolvimento da forma ativa da tuberculose é maior (American Thoracic Society, 2000).

A tuberculose é a principal causa de morte em adultos decorrente de um único agente infeccioso (Mazars et al., 2001). Esta doença continua sendo responsável por altos índices de mortalidade em todo o mundo, apesar de se conhecer seu agente etiológico e suas formas de transmissão, de dispor-se de quimioterápicos eficazes e de se praticar vacinação em larga escala nas populações (Leite & Telarolli Junior, 1997). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de dois bilhões de pessoas estão infectadas pelo *M. tuberculosis*, o que corresponde a um terço da população mundial, ocorrendo anualmente oito milhões de novos casos de tuberculose e três milhões de mortes (Raviglione et al., 1995).

Voltou-se hoje, como num passado não muito remoto da história da Medicina, a enfatizar-se a importância de fatores não-biológicos determinantes da morbidade e da mortalidade. Em algumas enfermidades a influência de tais fatores é mais nítida, como no caso da tuberculose (Pereira & Ruffino Netto, 2003). A simples presença do bacilo não basta para causá-la. Frequentemente, os fatores de ordem social, econômica e cultural têm que estar presentes para que a moléstia se desenvolva. Assim sendo, muitas vezes, alterações nas condições de vida das pessoas são fundamentais para explicar modificações em sua incidência e prevalência (Pereira & Ruffino Netto, 2003). Em todo o mundo, o mapa da prevalência da tuberculose se adapta ao mapa da miséria. A desnutrição deprimindo a imunidade celular justifica o maior adoecimento. Por si só, as condições de moradia, promíscuas, em cômodos únicos, e sem ventilação, propiciam uma maior carga infectante, que também condiciona o maior adoecimento por primo-infecção ou por re-infecção exógena (Marques & Cunha, 2003).

Atualmente, em várias regiões do mundo, considera-se que são responsáveis pela elevação alarmante da incidência da tuberculose, a infecção pelo HIV, o uso de drogas injetáveis, o aumento da pobreza, do número de desabrigados, a migração, a má nutrição, a urbanização e a perda da qualidade dos programas de controle da tuberculose (Antunes & Waldman, 1999; Marques & Cunha, 2003; Sola et al., 2003).

Antes do início da epidemia da Aids, aproximadamente 85% dos casos de tuberculose reportados eram pulmonares; os 15% dos casos restantes envolviam locais extrapulmonares ou ambas as formas (Farer et al., 1979). Esta distribuição é substancialmente diferente entre as pessoas infectadas com o HIV. Small et al. (1991), em um grande estudo retrospectivo de tuberculose em pacientes com Aids em infecção avançada, descreveram que 38% dos doentes apresentavam apenas o envolvimento pulmonar, 30% sítios extrapulmonares e 32% apresentavam envolvimento tanto pulmonar como extrapulmonar.

A epidemiologia busca identificar os fatores determinantes da distribuição da doença no tempo e no espaço, bem como os fatores envolvidos em sua transmissão, manifestação e evolução, sempre motivada pela oportunidade ou possibilidade de intervir e preveni-la (Higginson, 1977; Foxman & Riley, 2001).

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE

A epidemiologia molecular utiliza concomitantemente técnicas de biologia molecular, que caracterizam o conteúdo nucleotídico e a epidemiologia clássica, que estuda a distribuição e os fatores determinantes da doença nas populações humanas (Foxman & Riley, 2001).

Levin et al. (1999) definem que os objetivos práticos da epidemiologia molecular são identificar os microorganismos responsáveis por doenças infecciosas, determinar sua rota de transmissão e identificar os genes

responsáveis por sua virulência, resistência a drogas e produção de antígenos relacionados a vacinas. A epidemiologia molecular envolve, além do uso de técnicas moleculares para o estudo da taxonomia, filogenia ou genética de populações, a aplicação destas técnicas em problemas epidemiológicos (Foxman & Riley, 2001).

Marcadores moleculares são empregados, em estudos de epidemiologia molecular de doenças infecciosas, para rastrear a transmissão de linhagens específicas de seus agentes etiológicos. Esses dados são normalmente aplicados para descrever-se a distribuição de cepas em populações humanas e para verificar os fatores de risco de hospedeiros e parasitas, na dispersão da doença (Murray & Alland, 2002).

Assim, sistemas que possam diferenciar cepas de *M. tuberculosis* epidemiologicamente relacionadas, das outras não relacionadas, são ferramentas poderosas numa investigação de surtos de infecção hospitalar, ou comunitária, bem como para diferenciar reativação endógena de uma re-infecção exógena. A tipagem por bacteriófagos tem sido empregada com esta finalidade, mas o número de tipos delineados por esta metodologia é baixo, agrupando cepas não correlacionadas.

A tuberculose é um exemplo de doença infecciosa em que as técnicas de biologia molecular permitiram a obtenção de informações que seriam difíceis ou até mesmo impossíveis de serem conseguidas através de métodos laboratoriais convencionais.

Os métodos de tipagem baseada na seqüência de inserção IS6110 são usados para uma variedade de investigações epidemiológicas como a confirmação de surtos em Instituições, a identificação de surtos em situações que parecem ser de casos esporádicos de tuberculose, de fatores de risco para infecções recentes ou para doenças em progressão rápida, o rastreamento geográfico da distribuição de clones de *M. tuberculosis* de importância para a saúde pública e a avaliação de contaminação laboratorial cruzada com o *M. tuberculosis* (Foxman & Riley, 2001).

As espécies do complexo *M. tuberculosis* são geneticamente muito similares, com 85 a 100% de relação DNA-DNA diferindo entre si quanto à sua epidemiologia (Frothingham et al., 1994). Estas espécies possuem uma seqüência de inserção exclusiva em seu cromossomo identificada como IS6110, de 1.355 pares de base, relacionada à família IS3 das enterobactérias.

Um método de tipagem altamente discriminatório, baseado na variação da seqüência de DNA no genoma bacteriano, denominado de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) é amplamente utilizado no estudo epidemiológico da tuberculose. Este método baseia-se na digestão do DNA genômico bacteriano por enzimas de restrição, denominadas de endonucleases, que geram fragmentos de diferentes comprimentos. Os fragmentos são então separados em gel de agarose e hibridizados por sonda de DNA. A seqüência mais utilizada para o estudo epidemiológico da tuberculose é a IS6110. Todas as cepas de *M. tuberculosis* contém de uma a 20 cópias de IS6110. A

localização, assim como a quantidade de cópias dessa inserção presente no cromossomo, variam enormemente de cepa para cepa, mas são relativamente estáveis dentro da mesma cepa (Supply et al., 2001). Estudos epidemiológicos realizados com a utilização de uma metodologia padronizada, como o RFLP, permitem que os resultados obtidos em diferentes laboratórios possam ser analisados, o que possibilita a comparação entre linhagens de diferentes áreas geográficas e que permite que a movimentação de linhagens individuais possa ser rastreada (van Embden et al., 1993).

Dados assim são de grande importância no estudo da transmissão global da tuberculose e na identificação de linhagens com propriedades particulares, como alta infectividade, virulência e resistência a drogas. A análise de grande número de isolados pode gerar respostas para questões de longa data como a eficiência da vacinação com BCG e a freqüência de reativação versus re-infecção, questões estas que são de importância crescente com o surgimento da AIDS pandêmica (van Embden et al., 1993).

Em nosso laboratório, foi implantada por Malaspina (2004), a técnica de RFLP para tipagem de *M. tuberculosis*, quando estudou-se 49 amostras de *M. tuberculosis*; verificou-se que 28,9% delas pertenciam a um dos quatro "clusters" que foram denominados de A, A1, A2 e P. Estes resultados foram condizentes com aqueles obtidos no estudo feito através da epidemiologia clássica. Segundo Small et al. (1994), os casos de tuberculose associados às cepas em "cluster" são decorrentes de transmissão recente. Neste sentido, 28,9% dos casos de tuberculose em Araraquara eram provenientes de infecção recente e os demais 71,1% das amostras eram originários de reativação endógena. Estes dados mostraram a importância da continuidade do trabalho e a necessidade de se organizar um banco de dados dos pacientes com tuberculose pulmonar de Araraquara submetendo as cepas isoladas à técnica de RFLP.

Entretanto, apesar dos resultados promissores, a técnica de RFLP é trabalhosa, necessitando de pessoal altamente qualificado para a realização do ensaio, sendo tendência mundial, a substituição desta técnica por outras de execução mais rápida e facilitada. Neste sentido, outras seqüências têm sido utilizadas como marcadores epidemiológicos que incluem seqüências DR (*Direct Repeat*), espaçadores dentro da região DR (*Spoligotyping*) e seqüência polimórfica rica em GC (PGRS).

O cromossomo do *M. tuberculosis* contém múltiplas cópias da seqüência DR localizadas em um único locus cromossomal. A técnica de *Spoligotyping* é baseada na amplificação da região DR, pela PCR, e subsequente hibridização diferencial dos produtos amplificados com oligonucleotídeos, complementares às regiões espaçadoras variáveis localizadas entre as DRs, imobilizados em uma membrana de nylon, onde 43 dessas seqüências espaçadoras são previamente sensibilizadas. O polimorfismo dessa região, nas diferentes amostras, é provavelmente produto de uma recombinação homóloga do distante ou adjacente DR assim como as mudanças causadas pela localização da re-

gião da IS6110 (Rodriguez et al., 2004).

O produto da PCR obtido difere em tamanho por duas razões: primeiro, os amplificadores contêm muitos espaçadores com suas DRs se os oligonucleotídeos iniciadores ligarem em DRs não imediatamente vizinhas; segundo, os amplificadores em cada ciclo funcionam eles mesmos como iniciadores e se tornam alongados com uma ou mais DVRs (*direct variable repeats*), conforme descrito por Rodriguez et al. (2004).

Cepas que são similares, ou diferentes, podem ser identificadas pelos seus padrões analíticos gerados, característicos do número e identidade dos espaçadores contidos nas linhagens analisadas. A presença das seqüências espaçadoras varia em diferentes cepas e é visualizada por uma mancha em um ponto fixo da membrana de hibridização. Assim, segundo Kamerbeek et al., 1997, a técnica de *Spoligotyping* possibilita a detecção e a tipificação simultânea de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, e é indicada como técnica de escolha para a comparação de cepas com poucas cópias de IS6110. Outra vantagem é a distinção que se dá pela presença ou ausência de espaçadores.

O poder de distinção do *Spoligotyping* é menor do que o do RFLP, quando cepas com alto número de cópias de IS6110 são analisadas, entretanto, o poder de distinção do *Spoligotyping* é maior para a avaliação de cepas com baixo número de cópias. O método é simples, rápido e robusto, mas tem baixa discriminação (Kanduma et al., 2003; Rodriguez et al., 2004).

Em trabalho realizado por nosso grupo (Barco et al., 2006), a técnica de *Spoligotyping* foi empregada para discriminar 33 cepas de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes das regiões de São Paulo e Paraná, com marca de resistência à pirazinamida e a outros quimioterápicos. Essa avaliação possibilitou o agrupamento de algumas destas amostras em três "clusters" denominados A, B e C.

Métodos baseados em mini-satélites que contém número variável de repetições em seqüência (*variable numbers of tandem repeats* - VNTRs) foram demonstrados ser efetivos para a tipagem de *M. tuberculosis* (Kanduma et al., 2003). Dentre elas, destaca-se a técnica de epidemiologia molecular denominada MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*), que é um estudo baseado na reação em cadeia da enzima polimerase (PCR). Esta técnica foi desenvolvida por Supply et al. (2000; 2001) e se baseia no estudo de VNTRs, seqüências que se repetem seqüencialmente (de maneira adjacente) (*tandem repeats*) até centenas de vezes.

A técnica de MIRU consiste em um sistema altamente reprodutível e rápido, havendo geração de genótipos confiáveis baseado no estudo detalhado de 12 *loci* contendo VNTRs do genoma do complexo *M. tuberculosis* (Supply et al., 2001). Ela possibilita uma comparação entre linhagens de diferentes áreas geográficas e permite o rastreamento da movimentação de linhagens individuais (Supply et al., 2000; Mazars et al., 2001; Supply et al., 2001) de forma semelhante à técnica de RFLP sendo, no

entanto, de execução muito mais fácil. Este tipo de abordagem torna possível maior número de análises e identificação de mais focos de contágio na população, podendo assim estudar-se métodos mais adequados para interromper a transmissão da doença.

Objetivando diminuir o tempo de realização de MIRU, facilitar a manipulação das amostras e diminuir a chance de erros, Supply et al. (2001) demonstraram a aplicação de MIRU de modo automatizado, utilizando para tal, oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluorescência, que pode ser captada pela câmera CCD de um seqüenciador automático de DNA com capacidade para 96 amostras simultâneas. Dessa forma, cada amostra a ser avaliada para os 12 *loci* passa a ser desenvolvida em apenas quatro PCR-multiplex distintas, diminuindo a manipulação de amostras de DNA e otimizando o trabalho. A determinação do tamanho dos fragmentos amplificados (amplicons) é dada pelo seqüenciador e a definição de qual locus ele representa é obtida pela cor detectada pelo aparelho. Assim, em cada corrida de eletroforese um seqüenciador, que utiliza gel de acrilamida, pode dar o resultado final (dos 12 *loci* de MIRU) de 24 amostras, previamente amplificadas, em cerca de quatro horas e períodos ainda menores podem ser obtidos com seqüenciadores que utilizam capilares. Outra tentativa, bem sucedida, de automatização de MIRU foi feita por Evans et al. (2004), utilizando cromatografia líquida para a determinação dos tamanhos dos fragmentos amplificados (*amplicons*) pela técnica de PCR convencional, facilitando a determinação dos tamanhos das bandas e a classificação dos alelos, sem necessitar de equipamentos mais sofisticados ou reagentes fluorescentes caros. É importante salientar que os métodos automatizados de MIRU são muito mais caros que a versão manual, sendo justificado seu uso apenas em estudos de grande número de amostras.

Kwara et al. (2003) avaliaram a utilidade epidemiológica dos métodos de MIRU e de *Spoligotyping* e concluíram que o primeiro produz resultados melhores que o segundo. Resultados semelhantes a estes também foram obtidos em nosso laboratório (Pandolfi, 2006). Cowan et al. (2002), compararam as técnicas de MIRU, RFLP e *Spoligotyping* em um grupo de 180 amostras de *M. tuberculosis* e *M. bovis* com baixo número de cópias de IS6110, e verificaram que a técnica de MIRU possibilitou a observação de 80 padrões distintos, contra 58 de RFLP e 59 de *Spoligotyping* e que quando os resultados foram cruzados, 122 padrões foram obtidos, indicando que é necessário o emprego de vários métodos para se atingir maior poder discriminatório.

Niobe-Eyangoh et al. (2004) realizaram, com as técnicas de MIRU, *Spoligotyping* e RFLP, uma investigação preliminar da biodiversidade genética do Complexo *M. tuberculosis*, na República dos Camarões, um país com grande prevalência de tuberculose. Os resultados confirmaram predominância de uma linhagem específica de *M. tuberculosis* que foi denominada de "família de micobactérias Camarões". A demonstração da presença marcante de um genótipo particular na República dos Camarões permitiu um estudo mais refinado da transmissão da tuberculose, dentro de uma área geográfica.

Savine et al. (2002) relataram em suas pesquisas que em um grande número de linhagens e de *backgrounds* genéticos os 12 *loci* de MIRU são estáveis em um período superior a seis anos. Baseado nessa estabilidade de MIRUs, a descoberta de variações em seu genótipo pode auxiliar na definição de re-infecção exógena que é normalmente baseada na observação da variação de no mínimo três a quatro bandas de IS6110 RFLP. Esse recurso é particularmente importante para estimar os níveis de sucesso dos programas de controle de tuberculose e avaliação de novos métodos clínicos e novas terapias.

Para van Embden et al. (1993), a análise de grande número de isolados pode gerar respostas para questões de longa data como a eficiência da vacinação com BCG e a frequência de reativação versus re-infecção, questões estas que são de importância crescente com o surgimento da Aids. Devido à facilidade de execução, a técnica de MIRU torna possível este anseio. Os levantamentos bibliográficos reforçam ainda o emprego da tipagem com MIRU como uma ferramenta de primeira linha para o estudo da diversidade genética de isolados de *M. tuberculosis* em larga escala.

Bull et al. (2003) demonstraram que a técnica de MIRU também pode ser empregada para a diferenciação de *M. avium paratuberculosis* de outras espécies do complexo *M. avium*, acentuando assim ainda mais a importância do desenvolvimento deste ensaio.

A evolução e a intensidade com que a técnica de MIRU é empregada em diferentes problemas da biologia de Micobactérias gerou um avanço considerável nesta área, o que pode demonstrar a importância dos estudos de MIRU para o desenvolvimento mais acelerado da epidemiologia molecular e sugerir a necessidade de novos trabalhos, implementando este método e comparando o emprego de diferentes técnicas moleculares na epidemiologia e filogenia destes microrganismos, bem como a utilização de mais de um método para a obtenção de resultados ainda mais discriminatórios.

Assim, estudo de nosso grupo comparou as técnicas de MIRU com a de RFLP e de MIRU com a de *Spoligotyping*, quando observou-se que a capacidade de discriminação da primeira é comparável à da do RFLP, sendo superior à do *Spoligotyping* (Pandolfi, 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A existência de um banco de dados mundial de genótipos de MIRU, a reprodutibilidade e a facilidade de execução da técnica, em vários laboratórios ao redor do mundo, permite comparações entre dados obtidos nesses locais, favorecendo a geração de dados epidemiológicos mais consistentes e precisos.

Outros estudos com um maior número de amostras, estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório, empregando os métodos de MIRU e *Spoligotyping* e métodos de epidemiologia clássica, buscando analisar o comportamento das cepas isoladas no município de

Araraquara, SP. Esses estudos poderão indicar as medidas mais adequadas a serem tomadas no controle da tuberculose. Ademais, poderão também apontar tendências nos padrões epidemiológicos de cepas isoladas em uma cidade de cerca de 200 mil habitantes e naqueles obtidas numa grande metrópole.

ABSTRACT

Tuberculosis and the molecular study of its epidemiology

Systems that can distinguish epidemiologically-related *Mycobacterium tuberculosis* strains from unrelated ones are extremely valuable. Molecular biology techniques have allowed a great deal of information to be acquired about the infectious disease tuberculosis (TB) that was very hard or impossible to obtain by conventional epidemiology. A typing method based on bacterial DNA genome differences, known as RFLP (restriction fragment length polymorphism), is widely used to discriminate strains in the epidemiologic study of TB. However, RFLP is laborious and there is a tendency to replace it by other methods. Thus, other DNA sequences have been employed as epidemiological markers, as in Spoligotyping, a fast technique based on PCR followed by differential hybridization of amplified products. The polymorphism observed among different isolates is probably the product of strain-dependent recombination. MIRU (mycobacterial interspersed repetitive unit) typing is a reproducible and fast assay, involving the generation of genotypes based on the study of 12 loci containing VNTRs (variable-number tandem repeats) in strains of the *M. tuberculosis* complex. It compares strains from different geographic areas and allows the movement of individual lineages to be tracked, as in RFLP. This approach enables a greater number of isolates to be analyzed, leading to the identification of a larger number of foci of transmission within the population and thus to improved ways of slowing the progress of the disease.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis; tuberculosis, molecular epidemiology; genotyping

REFERÊNCIAS

American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1376-95.

Antunes JLF, Waldman EA. Tuberculosis in the twentieth century: time-series mortality in São Paulo, Brazil, 1900-97. *Cad Saúde Publ* 1999; 15(3):463-76.

- Barco P, Cardoso RF, Hirata RDC, Leite CQF, Pandolfi JR, Sato DN, Shikama ML, Fiúza de Melo F, Mamizuka EM, Campanerut PAZ, Hirata MH. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Southeast region of Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(5):930-5.
- Bloom, BR. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington: American society for microbiology; 1994. 637p.
- Bull TJ, Sidi-Boumedine K, McMinn EJ, Pockup R, Hermon-Taylor J. Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Cell Probes* 2003; 17:157-64.
- Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy number of IS 6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5):1592-602.
- Edwards D, Kirkpatrick CH. The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:1062-71.
- Evans JT, Hawkey PM, Smith EG, Boese KA, Warren RE, Hong G. Automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive units typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains by combination of PCR and nondenaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4175-80.
- Farer LS, Lowell LM, Meador MP. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am J Epidemiol* 1979; 312:205-17.
- Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol* 2001; 153:1135-41.
- Frothingham R, Hills HG, Wilson KH. Extensive DNA sequence conservation throughout the *M. tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1639-43.
- Higginson J. The role of the pathologist in environmental medicine and public health. *Am J Pathol* 1977; 86:460-84.
- Horsburgh J. Tuberculosis without tubercles. *Tuberc Lung Dis* 1996; 77:197-8.
- Kamerbeek J, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4):907-14.
- Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user's guide. *J Appl Microbiol* 2003; 94:781-91.
- Kwara A, Schiro R, Cowan LS, Hyslop NE, Wiser MF, Harrison SR, Kissinger P, Diem L, Crawford JT. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6):2683-85.
- Leite CQF, Telaroli Junior R. Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose. *Rev Ciênc Farm* 1997; 18(1):17-28.
- Levin BR, Lipsith M, Bonhoffer M. Population biology, evolution, and infection disease; convergence and synthesis. *Science* 1999; 283:806-9.
- Malaspina, AC. *Estudo da epidemiologia molecular da tuberculose em pacientes de Araraquara-SP no período de 2000 a 2002*. [Dissertação] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP; 2004.
- Marques AMC, Cunha RV. A medicação assistida e os índices de cura de tuberculose e de abandono de tratamento na população indígena Guarani-Kaiwá no Município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(5):1405- 11.
- Mazars E, Lesjean S, Banuls A, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayebnc 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.* 2001; 98(4):1901-6.
- Murray M, Alland D. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Am J Epidemiol* 2002; 155(6):565-71.
- Niobe-Eyangoh SN, Kuaban C, Sorlin P, Thonnon J, Vincent V, Gutierrez C. Molecular characteristics of strains of the Cameroon Family, the major group of *Mycobacterium tuberculosis* in a country with a high prevalence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5029-35.
- Pandolfi JRC. *Otimização da técnica de MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) para o estudo epidemiológico de paciente com tuberculose*. [Tese] Araraquara: Instituto de Química, UNESP; 2006.
- Pereira JCM, Ruffino-Netto A. Sobre Tuberculose. In: Pereira JCM editor. *Medicina, saúde e sociedade*. Ribeirão Preto: Complexo Gráfico Villimpress; 2003. p.149-171.
- Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995; 273:220-6.
- Rodriguez CAR, Zumárraga MJ, Oliveira EM, Cataldi AA, Romano MI, Otto HH, Bonafé VL, Ferreira Neto JS. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo, utilizando a técnica de Spoligotyping. *Arq Inst Biol (São Paulo)* 2004; 71(3):277-82.

- Sato DN. *Mycobacterium Bacteriologia*: um texto ilustrado. Rio de Janeiro: Eventos Editora; 1999. p.285-315.
- Savine E, Warren RM, van Der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Locht C, Supply P. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4561-6.
- Sherris JC. Mycobacteria. In: Sherris JC. *Medical microbiology: an introduction to infectious diseases*. New York: Elsevier Science; 1984. p.291-304.
- Small PM, Schecter GF, Goodman PC, Sande MA, Chaisson RE, Hopewell PC. Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1991; 324:289-94.
- Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schecter GF, Daley CL, Schoolnik GK. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994; 330:1703-9.
- Smith D, Wiengeshaus E. What animal models can teach us about the pathogenesis of tuberculosis in humans. *Rev Infect Dis* 1989; 11:S385-93.
- Sola C, Filliol I, Legrand L, 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* 2003; 3:125-33.
- Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. *Microbiologia ilustrada*. Porto Alegre: Artmed; 2004. p.259-72.
- Supply P, Mazars E, Lsejean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 36(3):762-71.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, 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* 2001; 39(10):3563-71.
- van Embden JDA, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31:406-09.