



CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLADOS DE PACIENTES DOS MUNICÍPIOS BRASILEIROS DA TRÍPLICE FRONTEIRA BRASIL/PARAGUAI/ARGENTINA POR *MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNITS* (MIRU)

Hayalla Corrêa de Carvalho (PIBIC/CNPq/Uem), Regiane Bertin de Lima Scodro, Aryadne Larissa de Almeida, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferraciolli, Vera Lucia Dias Siqueira, Rosilene Fressatti Cardoso (Orientadora), e-mail: rfcardoso@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Microbiologia-Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Tuberculose, Genotipagem, MIRU

Resumo

A tuberculose (TB) é um importante problema de saúde pública e as técnicas de biologia molecular oferecem apoio no controle de surtos de TB, identificando genótipos circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* em uma região específica. Um dos métodos utilizados é *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU), que por PCR são analisadas sequências homólogas de 46 a 100 pb de DNA que se repetem sequencialmente (*tandem repeats*) e que estão dispersas em regiões intergênicas no genoma de *M. tuberculosis*. O objetivo do presente estudo foi caracterizar molecularmente *M. tuberculosis* isolados de pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar provenientes de municípios atendidas pela 9ª e 10ª Regionais de Saúde do Estado do Paraná utilizando a metodologia MIRU. Dos isolados clínicos analisados, 51 (66,2%) isolados apresentaram perfis únicos de 12 *loci*-MIRU-VNTR e 33,8% foram agrupados em 10 *clusters*. A metodologia usada mostrou ser uma ferramenta com grande potencial para diferenciação genotípica de *M. tuberculosis*.

Introdução

A tuberculose (TB) é um grande problema de saúde global, causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* e é classificada como a segunda principal causa de morte por doença infecciosa (WHO, 2014).



A aplicação de técnicas de biologia molecular em estudos epidemiológicos concomitantes a epidemiologia clássica da TB, tem trazido enormes contribuições para entender as relações entre micro-organismos e hospedeiros. Dentre as técnicas utilizadas de genotipagem, a metodologia *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU) utiliza sequências que se repetem até centenas de vezes no genoma do bacilo, chamadas de *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTRs) tem se mostrado muito eficiente (Supply et al., 2000). Portanto, o nosso objetivo foi caracterizar molecularmente *M. tuberculosis* isolados de pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar provenientes de municípios atendidos pela 9ª e 10ª Regionais de Saúde do Estado do Paraná, utilizando a metodologia 12 *loci*-MIRU-VNTR.

Materiais e métodos

Os 77 isolados clínicos de *M.tuberculosis* foram cultivados em meio Lowenstein-Jensen (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA) à 35°C por 15 dias. O DNA micobacteriano foi extraído utilizando o kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen).

A amplificação de 12 *loci*-MIRU-VNTR (Quadro 1) foi realizada em termociclador Veriti 96.(Applied Biosystems, USA) de acordo com Supply et al., (2000).Os produtos de cada reação de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% e analisados pelo SITVITWEB (<http://goo.gl/eqjsRZ>).

Resultados e Discussão

Dos 77 pacientes estudados, 65 (84,41%) eram provenientes de Foz do Iguaçu, 8 (10,41%) de Cascavel e 4 (5,19%) de Toledo.

A realização de 12 *loci*-MIRU-VNTR possibilitou a diferenciação dos 77 isolados clínicos de *M. tuberculosis* com 61 perfis diferentes. Dentre estes, ocorreram 10 clones com similaridade de 100% (33,8% dos isolados) (Tabela 1). Dois *clusters* agruparam 4 isolados cada, 2 agruparam 3 isolados cada e 6 agruparam 2 isolados cada. Os demais 51 (66,2%) isolados apresentaram perfis únicos de 12 *loci*-MIRU-VNTR (Tabela 2). Estudo similar realizado por Machado et al., (2014) no Oeste do Paraná, com 96 isolados de *M. tuberculosis* também encontrou 10 *clusters* (23,96%) com agrupamentos de 2 a 3 isolados cada e 76,04% de isolados apresentaram perfis únicos.



Tabela 1 – 12 loci-MIRU-VNTR de clones de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de pacientes atendidos pela 9ª e 10ª Regionais de Saúde do Estado do Paraná.

Nº do isolado	MIRU12	12-MIT	Cidade	Cluster
F11	224226163321	26	Foz do Iguaçu	I
F52	224226163321	26	Foz do Iguaçu	
F59	224226163321	26	Foz do Iguaçu	
F86	224226163321	26	Foz do Iguaçu	
F2	225313153323	42	Foz do Iguaçu	
F42	225313153323	42	Foz do Iguaçu	
F77	225313153323	42	Cascavel	
F12	224326133323	251	Foz do Iguaçu	III
F45	224326133323	251	Foz do Iguaçu	
F4	124326143324	519	Cascavel	IV
F36	124326143324	519	Foz do Iguaçu	
F75	124326143324	519	Toledo	
F32	224226143321	738	Foz do Iguaçu	V
F55	224226143321	738	Foz do Iguaçu	
F14	123326143324	Órfão	Foz do Iguaçu	VI
F16	123326143324	Órfão	Foz do Iguaçu	
F81	125326153122	Órfão	Foz do Iguaçu	VII
F84	125326153122	Órfão	Foz do Iguaçu	
F1	224125152321	Órfão	Foz do Iguaçu	VIII
F3	224125152321	Órfão	Foz do Iguaçu	
F49	233325153334	Órfão	Foz do Iguaçu	IX
F61	233325153334	Órfão	Foz do Iguaçu	
F63	233325153334	Órfão	Foz do Iguaçu	
F64	233325153334	Órfão	Foz do Iguaçu	
F13	333325173334	Órfão	Foz do Iguaçu	
F60	333325173334	Órfão	Foz do Iguaçu	

Tabela 2 - 12 loci-MIRU-VNTR de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* com perfis únicos provenientes de pacientes atendidos pela 9ª e 10ª Regionais de Saúde do Estado do Paraná

Nº do Isolado	MIRU12	12-MIT	Cidade	Cluster
F26	224326143324	39	Toledo	único
F44	225325153323	45	Foz do Iguaçu	único
F38	225325153324	46	Foz do Iguaçu	único
F15	224325143324	117	Foz do Iguaçu	único
F48	124326153224	140	Foz do Iguaçu	único
F54	124328153326	180	Foz do Iguaçu	único
F62	223326143323	183	Foz do Iguaçu	único
F73	225313153322	184	Foz do Iguaçu	único
F7	125326153222	483	Cascavel	único
F89	124326163224	565	Foz do Iguaçu	único
F76	225325123323	775	Foz do Iguaçu	único
F17	122225153324	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F33	124221153223	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F57	124226143324	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F71	124326133225	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F50	124326133226	Órfão	Cascavel	único
F70	124326133323	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F85	124326143325	Órfão	Toledo	único
F18	124526153324	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F23	125326143324	Órfão	Cascavel	único
F51	125326153224	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F5	125326153323	Órfão	Cascavel	único
F22	126313153223	Órfão	Cascavel	único
F25	134325173334	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F83	134326153222	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F78	223316163228	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F87	224126153322	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F27	224136142321	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F9	224223163121	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F80	224225173321	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F6	224313153621	Órfão	Cascavel	único
F79	224313163324	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F8	224316143226	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F29	224316153227	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F56	224316153228	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F53	224316154228	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F21	224316173228	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F35	224326143226	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F67	224326173224	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F47	225215163323	Órfão	Toledo	único
F28	225225133323	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F69	225313143332	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F72	225313153222	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F19	225326153325	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F20	226313151323	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F65	226314153323	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F82	233325122325	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F74	233425153335	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F10	234325153334	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F66	324216143221	Órfão	Foz do Iguaçu	único
F58	324226183321	Órfão	Foz do Iguaçu	único



Conclusões

12 *loci*-MIRU-VNTR mostrou ser uma ferramenta com grande potencial para diferenciação genotípica de *M. tuberculosis*. Porém, ocorreram casos em que alguns isolados não puderam ser diferenciados. Neste sentido, a utilização de outra metodologia, com este objetivo, como *Spoligotyping* ou mesmo o estudo de maior número de VNTRs como 24 *loci*-MIRU-VNTR poderá fazer uma diferenciação maior entre isolados diferentes.

Agradecimentos

CNPq.

Referências

MACHADO, L. N. C. et al. First baseline of circulating genotypic lineages of Mycobacterium tuberculosis in patients from the Brazilian borders with Argentina and Paraguay. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107106, 2014.

SUPPLY, P. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4498–4510, dez. 2006.

SUPPLY, P. et al. Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome. **Molecular microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762–771, maio 2000.

World Health Organization 2014. Global tuberculosis report 2014. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/> Acesso em 10/06/2015.