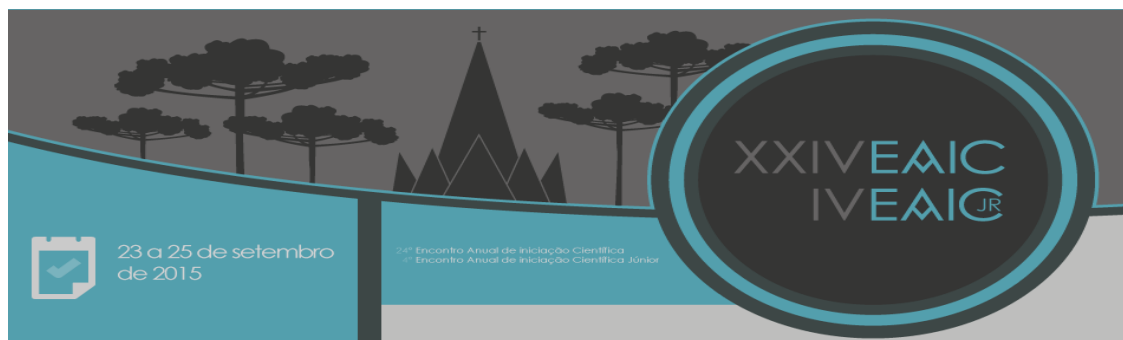




OTIMIZAÇÃO DA TIPAGEM MOLECULAR PELA TÉCNICA DE 24-LOCI-MIRU-VNTR (24 *LOCI-MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNITS*)

Giovana Ferreira Costacurta (PIBIC/CNPq/UEM), Aryadne Larissa de Almeida, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli, Vera Lucia Dias Siqueira, Rosilene Fressatti Cardoso, Regiane Bertin De Lima Scodro (Orientadora),
e-mail: rblscodro@uem.br

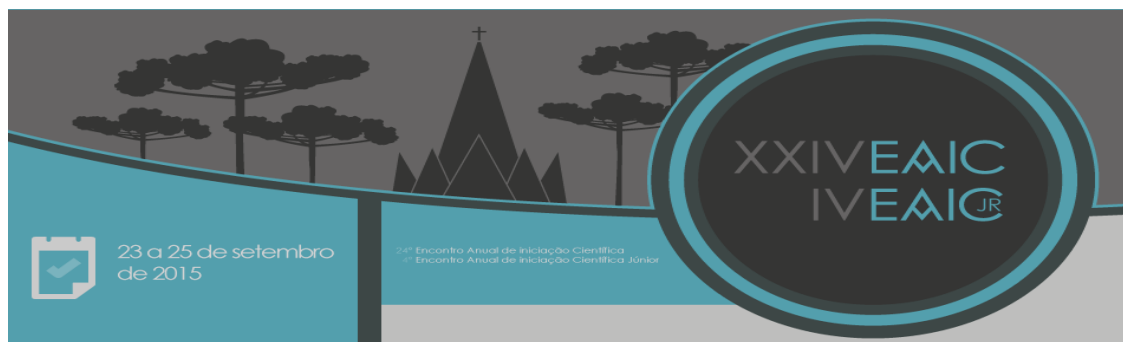
Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, Paraná, Brasil.

Microbiologia – Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Tuberculose, MIRU, Genotipagem

Resumo:

A tuberculose (TB) é um importante problema de saúde pública, particularmente nos países em desenvolvimento. Técnicas moleculares para diferenciar isolados de *Mycobacterium tuberculosis*, tais como *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU), utilizando 12 pares de iniciadores para amplificar regiões VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*), possibilitam agrupar isolados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes que apresentam ligações epidemiológicas. Desta forma, pode-se identificar cadeias de transmissão de determinado isolado por diferenciação clonal. Porém, alguns isolados apresentam 12 *loci*-MIRU idênticos exigindo a utilização de maior número de VNTRs para a diferenciação. Este trabalho objetiva ampliar os estudos com a técnica de MIRU utilizando 24 iniciadores para amplificar um maior número de VNTR. Com isto poderemos compreender um pouco mais sobre a epidemiologia da TB com isolados clínicos provenientes de pacientes oriundos da tríplice fronteira Brasil/Paraguai/Argentina. Para isso, 40 isolados clínicos previamente genotipados com 12 *loci*-MIRU-VNTR, foram submetidos a tipagem com outros 12 iniciadores e também com 5 VNTRs (ETR A, B, C, D e E). Com a técnica 12 *loci*-MIRU-VNTR ocorreram dez clones contendo 26 isolados e quando foi aplicado o 24 *loci*-MIRU-VNTR houve uma diferenciação de 13 isolados. Foi também utilizado a análise de 12 *loci*-MIRU-VNTR e 5 ETRs que apresentou menor desempenho para diferenciação. 24 *loci*-MIRU-VNTR conseguiu reduzir em 50% o número de isolados que apresentavam o mesmo perfil genotípico. Isto demonstra um aumento do poder discriminatório dos isolados de *M. tuberculosis* com a utilização do 24-*loci*-MIRU-VNTR.



Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que continua sendo um importante problema de saúde pública no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (MA et al., 2010). 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. A metodologia *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units/Variable Number Tandem Repeat* (MIRU-VNTR) utiliza a variabilidade na quantidade de seguidas repetições de sequências específicas no genoma das linhagens de *M. tuberculosis* (SUPPLY et al., 2006). Assim, o objetivo deste estudo foi ampliar os estudos com a técnica de MIRU-VNTR utilizando 24 iniciadores para amplificar um maior número de VNTR. Com isto poderemos compreender um pouco mais sobre a TB avaliando isolados clínicos provenientes de pacientes da tríplice fronteira Brasil/Paraguai/Argentina.

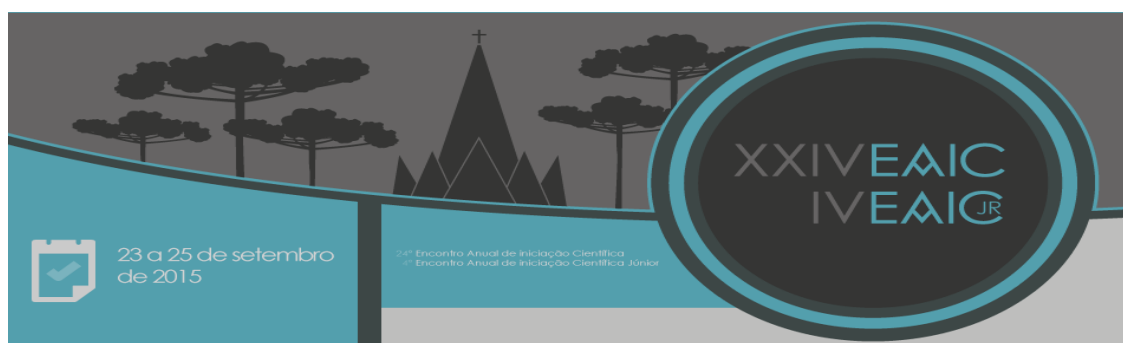
Materiais e métodos

Foram utilizados 40 isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de pacientes da tríplice fronteira Brasil/Paraguai/Argentina. Os isolados clínicos de *M. tuberculosis* cultivados em Lowenstein-Jensen (BBL™ – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA) foram submetidos a extração do DNA utilizando o kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, USA).

Os DNAs extraídos foram previamente amplificados para obtenção dos perfis de 12-loci-MIRU-VNTR em termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems, USA) de acordo com Supply et al. (2000). Após o agrupamento primário, foi realizada amplificação com mais 12 pares de oligonucleotídeos iniciadores como descritor por Santos et al. (2012) para completar 24 loci-MIRU-VNTR. Os produtos de cada reação de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% e analisados de acordo com Supply et al., (2006) e pelo SITVITWEB (<http://migre.me/qm2d4>) para obtenção do MIRU International Type (MIT) de cada isolado *M. tuberculosis*.

Resultados e Discussão

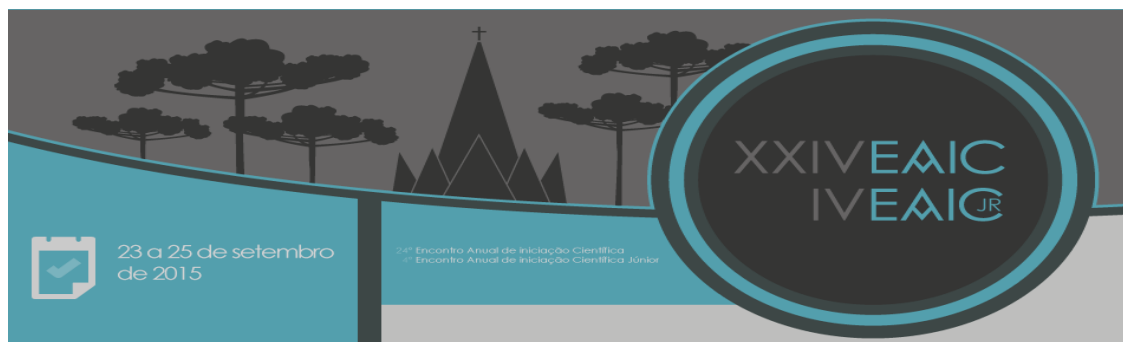
O 12 loci-MIRU-VNTR não possibilitou 100% de diferenciação entre os 40 isolados analisados. Com esta metodologia ocorreram dez clones contendo 26 isolados com similaridade de 100% entre os perfis. Destes, dois clones agruparam quatro isolados cada, dois agruparam três isolados cada e seis agruparam dois isolados cada. Quando foi aplicado o 24 loci-MIRU-VNTR nos 26 isolados que estavam agrupados em clones, houve uma



diferenciação de 13 isolados. Isto demonstra o melhor poder discriminatório do 24 *loci*-MIRU-VNTR quando comparado ao 12 *loci*-MIRU-VNTR (Tabela). Foi também utilizado uma análise disponível no SITVITWEB que utiliza os valores obtidos com 12 *loci*-MIRU-VNTR e 5 ETRs (A, B, C, D e E) para a caracterização molecular de *M. tuberculosis*. Esta análise apresentou menor desempenho para diferenciação dos 26 isolados agrupados (Tabela) quando comparado com a utilização de 24 *loci*-MIRU-VNTR.

Tabela – Perfil genotípico de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de pacientes atendidos pela 9ª e 10ª Regionais de Saúde do Estado do Paraná utilizando 12 e 24 *loci*-MIRU-VNTR e 5 VNTR.

Isolados	12 <i>loci</i> -MIRU	12MIT	Clone	24 <i>loci</i> -MIRU	VIT
F11	224226163321	26	1	224226163321224534132236	9
F52	224226163321	26		224226163321224434132236	9
F86	224226163321	26		224226163321224434132236	9
F59	224226163321	26		224226163321224434132236	9
F02	225313153323	42	2	225313153323313322333257	242
F42	225313153323	42		225313153323323224333257	97
F77	225313153323	42		225313153323323422313256	97
F45	224326133323	251	3	224326133323224524211246	9
F12	224326133323	251		224326133323224524211246	9
F04	124326143324	519	4	124326143324224434132223	9
F36	124326143324	519		124326143324224334132223	9
F75	124326143324	519		124326143324224334132222	9
F32	224226143321	738	5	224226143321214334142224	198
F55	224226143321	738		224226143321214534142224	198
F07	125326153222	483	6	12532615322224734132227	
F01	224125152321	orfão		224125152321114534142228	240
F03	224125152321	orfão		224125152321114534142228	240
F14	123326143324	orfão	7	123326143324224434132223	9
F16	123326143324	ordão		123326143324224434132223	9
F13	333325173334	orfão	8	333325173334324414233226	23
F60	333325173334	orfão		333325173334324314223226	23
F49	233325153334	orfão	9	233325153334324414223221	23
F61	233325153334	orfão		233325153334324314223226	23
F63	233325153334	orfão		233325153334324312223226	23
F64	233325153334	orfão		233325153334324314223225	23
F81	125326153122	orfão	10	125326153122224544132226	Orfão
F84	125326153122	orfão		125326153122224444132226	Orfão



F05	125326153323	orão	125326153323224234132227
F06	224313153621	orão	224313153621323332333257
F08	224316143226	orão	224316143226224414132225
F09	224223163121	orão	224223163121224534132248
F10	234325153334	orão	234325153334324414223226
F17	122225153324	orão	122225153324324324134235
F18	124526153324	orão	124526153324224214132227
F19	225326153325	orão	225326153325224434132225
F20	226313151323	orão	226313151323323322333266
F22	126313153223	orão	126313153223323222333247
F23	125326143324	orão	125326143324224334132223
F25	134325173334	orão	134325173334324314223226

Conclusões

A técnica utilizada, 24 *loci*-MIRU-VNTR, mostrou ser uma ferramenta com grande potencial para diferenciação genotípica de *M. tuberculosis*. 24 *loci*-MIRU-VNTR conseguiu reduzir em 50% o número de isolados que apresentavam o mesmo perfil genotípico por 12 *loci*-MIRU-VNTR. A utilização de ETRs (A, B, C, D e E) adicionado ao 12 *loci*-MIRU-VNTR não melhorou significativamente o poder de diferenciação dos isolados clínicos que estavam agrupados.

Agradecimentos

CNPq

Referências

MA, Z. et al. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **Lancet** v. 375, p. 2100-2109, 2010.

SANTOS, A.C.B. **Genotipagem de isolados de Mycobacterium tuberculosis provenientes de comunidades indígenas do Mato Grosso do Sul – MS**. 2012. 114 f. (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista.

SUPPLY, P. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 4498-4510, 2006.

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