

AUDREY JORDÃO BASSO

**GENOTIPAGEM, UTILIZANDO A SEQÜÊNCIA DE
INSERÇÃO IS6110, DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*
ISOLADAS DE PACIENTES PORTADORES DA INFECÇÃO
PELO HIV EM MOÇAMBIQUE, ÁFRICA**

CAMPINAS

2006

AUDREY JORDÃO BASSO

**GENOTIPAGEM, UTILIZANDO A SEQUÊNCIA DE
INSERÇÃO IS6110, DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*
ISOLADAS DE PACIENTES PORTADORES DA INFECÇÃO
PELO HIV EM MOÇAMBIQUE, ÁFRICA**

*Tese de Mestrado apresentada a Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Clínica Médica, área de concentração
em Clínica Médica.*

ORIENTADOR PROF. DR. MARCELO DE CARVALHO RAMOS

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B295g Basso, Audrey Jordão
Genotipagem, utilizando a seqüência de inserção IS6110, de cepas de Mycobacterium tuberculosis isoladas de pacientes portadores da infecção pelo HIV em Moçambique, África / Audrey Jordão Basso. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Marcelo de Carvalho Ramos
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Moçambique. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3. RFLP. 4. IS6110. 5. Polimorfismo. 6. Aids (Doença) – África. 7. HIV (Vírus). I. Ramos, Marcelo de Carvalho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : IS6110 Polymorphism in Mycobacterium tuberculosis isolates from HIV infected patients living in Mozambique, África

Keywords:

- Mozambique
- Mycobacterium tuberculosis
- RFLP
- IS6110
- Polymorphism
- Aids (Diseases) Africa
- HIV (Virus)

Área de concentração : Clínica Médica

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

**Banca examinadora: Prof Dr Marcelo de Carvalho Ramos
Prof. Dra. Ana Lúcia Roscani Calusni
Prof. Dra. Lucilaine Ferrazoli**

Data da defesa: 24-08-2006

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Mestrado

Orientador: *Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos*

Membros

1. Profa. Dra. Ana Lúcia Roscani Calusni_____
 2. Profa. Dra. Lucilaine Ferrazoli_____
 3. Profa. Dra. Mariângela Ribeiro Resende_____
 4. Prof. Dr. José Fernando de Castro Figueiredo_____
-

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/08/06

DEDICATÓRIA

MEUS PAIS,

Geraldo e Regina, que foram a base para a minha formação, pelo apoio, pelo convívio prazeroso do dia-dia, carinho e confiança depositada.

À MINHA IRMÃ ALINE,

grande amiga para todas as horas e companheira para toda a vida. Obrigada por tudo que faz e tem feito por mim.

A DEUS,

sempre presente na minha vida. Obrigado por tornar possível a realização desse projeto

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, referente à bolsa de Mestrado e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, referente aos recursos financeiros para a execução do projeto.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos, pela oportunidade de trabalhar neste projeto, pelo conhecimento e tranqüilidade durante o processo.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Maria Cecília Barisson Villares, pela confiança, carinho e credibilidade.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do Setor de Patologia Clínica do HC/UNICAMP, em especial aos técnicos Cidinha, Dalva e Wagner.

Aos colegas do Laboratório de Patogênese Bacteriana e Biologia Molecular da FCM/UNICAMP Alessandra, Arlete, Eliane, Gisele, Luciana e Patrícia, pelo apoio e pelas horas agradáveis que passamos juntos.

A Dra. Alessandra Costa Panunto pela amizade, disponibilidade e pelos ensinamentos iniciais nas técnicas de Biologia Molecular e Genotipagem.

Ao Dr. Eduardo Mello Capitani e Dra. Elizabete Abrantes Nunes, pela doação das cepas de *M. tuberculosis* e recursos financeiros necessários à execução do projeto.

Ao Dr. Philip Noel Suffys e ao Mestrando Diogo Netto, pelas análises computacionais realizadas no Laboratório de Hanseníase na Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ.

Ao Laboratório de Farmacologia e Bioquímica da FCM/UNICAMP, por ceder o espaço para a revelação do filme RX.

Aos membros da banca examinadora, pela gentileza e disponibilidade.

Aos pacientes.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para esse trabalho.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xvi</i>
ABSTRAT	<i>xviii</i>
1- INTRODUÇÃO	20
1.1- Considerações gerais a respeito da epidemiologia da tuberculose e sua situação na África Subariana	21
1.2- Características Microbiológicas do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
1.3- Métodos de Biologia Molecular Aplicados à epidemiologia da Tuberculose	24
1.4- Elemento Transponível – Sequência de Inserção IS	26
2- OBJETIVOS	28
3- MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1- Casuística	31
3.2- Identificação dos isolados	31
3.2.1- Amplificação do <i>hsp65</i>	31
3.2.2- Digestão pela <i>BstEII</i>	32
3.2.3- Digestão pela <i>HaEIII</i>	32
3.2.4- Análise do gel após a digestão pelas enzimas.....	33
3.3- Extração do DNA genômico	34
3.3.1- Estimativa da concentração do DNA.....	34

3.3.2- Eletroforese.....	35
3.4- Digestão do DNA genômico por enzima de restrição do DNA extraído.....	35
3.5- Eletroforese	36
3.6- Southern Blotting.....	37
3.6.1- Preparação do gel para o Southern Blotting.....	37
3.6.2- Tratamento da membrana depois do Southern Blotting.....	37
3.7- Construção da sonda molecular.....	38
3.7.1- Amplificação do DNA pela reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	38
3.7.2- Marcação da Sonda.....	39
3.8- Hibridização.....	39
3.9- Lavagem da membrana depois da hibridização.....	40
3.10- Detecção.....	40
3.11- Análise dos perfis moleculares.....	40
4-RESULTADOS.....	41
5- DISCUSSÃO.....	48
6- CONCLUSÃO.....	53
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
8- ANEXO 1: PUBLICAÇÃO.....	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BsteII	Enzima de restrição isolada de <i>Bacillus stearothermophilus ET</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention – Centro para o Controle e Prevenção de Doenças
CTAB	Brometo de N-cetil- N, N,N- trimetil amônio
DNA	Ácido desorribonucléico
dNTP	Composto pelos 4 nucleotídeos (A-T-C-G)
DPC	Departamento de Patologia Clínica
DR	DNA repetitivo
ECL	Direct Nucleic Acid Labelling and detection systems – sistema de detecção e marcação de ácidos nucléicos
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H₂O	Água
H37Rv	Cepa de Referência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
HaeIII	Enzima de restrição isolada de <i>Haemophilus aegyptius</i>
HC	Hospital de Clínicas

HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IS	Seqüência de inserção
IS1081	Seqüência de inserção 1081
IS1547	Seqüência de inserção 1547
IS3	Seqüência de inserção 3
IS6110	Seqüência de inserção 6110
IWGMT	Cepa de Referência do <i>Mycobacterium avium</i>
L-J	Löwenstein – Jensen
M	Molar
M. bovis	<i>Mycobacterim bovis</i>
MDR	multidroga-resistente
M. tuberculosis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	mililitro
MT 14323	Cepa de referência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio

ng	Nanograma
°C	Graus Centígrados
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRA	Análise de Padrão de Restrição
PvUII	Enzima de restrição obtida de <i>Proteus vulgaris</i>
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Rotação por Minuto
SDS	Sódio Duodecil Sulfato
SSC	Solução Salina de Citrato
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	Tris 89mM, Ácido Bórico 89mM e EDTA 2,5 mM
TE	Tris- EDTA
U	Unidade
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultra-Violeta
V	Volts
Vol	Volume
WHO	World Health Organization – Organização Mundial da Saúde
µg	Micrograma
µL	Microlitro

	Pág.
Figura 1- Coloração de Ziehl Neelsen positivo para BAAR.....	23
Figura 2- Crescimento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em meio sólido de L-J.....	23
Figura 3- Mapa físico do elemento de inserção IS6110.....	27
Figura 4- Identificação da cepas de <i>M. tuberculosis</i> pelo método PRA-PCR....	33
Figura 5- Extração de DNA.....	35
Figura 6 Corrida eletroforética em gel de agarose 1%, 20h de corrida	36
Figura 7- População estudada.....	42
Figura 8- Perfil genotípico das cepas estudadas.....	43
Figura 9- “Clusters” encontrados no estudo.....	44
Figura 10- Dendrograma do RFLP.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>Pág.</i>
Gráfico 1- Distribuição das IS6110	45
Gráfico 2- Distribuição das IS6110 e seus respectivos “clusters”	46

RESUMO



A técnica do estudo do polimorfismo de fragmentos de restrição, com a pesquisa da seqüência de inserção IS6110 (IS6110-RFLP), é o método de genotipagem mais empregado mundialmente para a caracterização de isolados de *M. tuberculosis*. Ela pode ser empregada para o estudo de surtos, epidemias ou para estudos de genética populacional. Em Moçambique, onde a tuberculose tem uma elevada prevalência, não há informação suficiente sobre os padrões genotípicos obtidos com a IS6110-RFLP de cepas locais de *M. tuberculosis*. A descrição dos padrões obtidos com essa metodologia pode ser útil localmente para propósitos epidemiológicos ou, internacionalmente, para descrever o relacionamento de cepas isoladas em Moçambique com outras áreas do mundo. Neste estudo, uma coleção de 158 isolados de *M. tuberculosis*, identificados com o emprego da análise de fragmentos de restrição após a amplificação de trecho do gene *hsp65* (*hsp65*-PRA), recuperados de pacientes infectados pelo HIV com tuberculose pulmonar e que residiam em Maputo, Moçambique, foram genotipados. O número de seqüências IS6110 obtido variou de 1 to 18, com 21.5% dos isolados exibindo menos de seis cópias. Um total de 10 “clusters” foram caracterizados, um com três isolados e os demais com dois cada. Os isolados que exibiram menos de seis seqüências não foram incluídos na análise, dado o baixo poder discriminatório do método. Baseado no coeficiente de similaridade, 85% dos isolados tinham mais do que 65% de homologia. Esses dados mostram que, isolados de *M. tuberculosis* obtidos em Moçambique, África, podem ser analisados, para fins epidemiológicos com o auxílio dessa técnica de genotipagem. Entretanto, um considerável número de isolados exibiu um número pequeno de cópias da seqüência IS6110 e um segundo marcador genético, como a espoligotipagem, deve ser utilizado.

ABSTRACT



IS6110 RFLP has been the most widely used genetic subtyping method for *M. tuberculosis* strains, to characterize disease outbreaks or for evolutionary genetics studies. In Mozambique, where tuberculosis exhibits a high prevalence, there is not enough information about IS6110-RFLP patterns of local *M. tuberculosis* strains. The description of the fingerprinting patterns obtained with this methodology can be useful locally for epidemiological purposes, and internationally to investigate the relatedness of strains isolated in Mozambique to other areas of the world. In this study, a collection of 158 isolates of *M. tuberculosis* strains, as identified by using *hsp65*-PRA, recovered from HIV-infected patients with pulmonary tuberculosis residing in Maputo, Mozambique, was genotyped. The number of IS6110 copies ranged from 1 to 18, with 21.5% of strains exhibiting less than six copies. A total of 10 clusters were found, one consisting of three strains and all the others of two strains. Isolates showing less than six bands were not included in the cluster analyses due to low discriminatory power of the analysis. Based on similarity coefficients 85% of strains had more than 65% homology. This data show that *M. tuberculosis* strains obtained in Mozambique, Africa can be analyzed for epidemiological purposes with the use of this genotyping technique. However, a considerable number of strains exhibited a low number of IS6110 copies, and a second genetic marker as spoligotyping has to be used.

1 – INTRODUÇÃO

1.1- Considerações gerais a respeito da epidemiologia da tuberculose e sua situação na África sub-saariana.

Pode-se dizer que o *Mycobacterium tuberculosis* é um dos microrganismos de maior sucesso na história do homem. Apesar do uso intenso de fármacos contra a tuberculose por mais de 50 anos, ele continua provocando enorme mortalidade em todo o mundo (Burgos et al., 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 2004, cerca de 1,7 bilhões de pessoas, ou um terço da população mundial, está infectada por esse microrganismo. A situação atual da tuberculose no mundo espelha o desequilíbrio socioeconômico entre os países. Cerca de 95% dos casos e 98% das mortes a ela devidas ocorrem nos países em desenvolvimento e com poucos recursos econômicos (Ait-Khaled e Enarson, 1999). Três milhões de mortes ao ano são a ela atribuídas, posicionando-a como quinta causa mais freqüente de morte no mundo. O número de casos tem crescido a uma taxa de cerca de 2% ao ano e a sua resistência a múltiplas drogas (MDR) também é um problema que vem aumentando (Raviglione et al., 2001). Baseado nesse cenário, pode-se dizer que há um sério descontrole da situação global da tuberculose.

A disseminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) também contribuiu para um aumento substancial na incidência da tuberculose, bem como na seleção de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a vários fármacos (Mac et al., 2001). Juntas, a tuberculose e a aids causam mais mortes em adultos do que qualquer outra doença infecciosa.

Nos países em desenvolvimento, os da África em particular, houve um aumento recente acentuado das taxas de morbidade e mortalidade da tuberculose. Nesse momento ela é responsável por cerca de 25% de todas as causas de morte em adultos nesses locais. Os coeficientes de incidência mais elevados de tuberculose, assim como o risco anual de infecção, são encontrados no sudeste Asiático (182/100.000) e na África sub-saariana (400/100.000 hab.) (WHO 2004). Em 80% das vezes a doença acomete pessoas do grupo etário de 15-59 anos, pertencentes à força laboral e reprodutiva (Leung, 1999).

Ainda, nessas regiões, cerca de oito milhões de pessoas estão co-infectadas pelo HIV. Anualmente, 5 a 10% desses indivíduos desenvolvem tuberculose. Desse total de co-infectados, 37% vivem nos seguintes países do sul da África: Botswana, Tanzânia, Malawi, Zimbabwe e Moçambique (Ministério da Saúde de Moçambique, 1994).

Moçambique tem uma população de 18.644.433 milhões de habitantes. A prevalência de tuberculose é de 265/100.000 hab. e 48% desses também apresentam infecção pelo HIV (Nunes et al., 2005). A morbidade por tuberculose e aids aumentou nos últimos anos, apesar do eficiente Programa Nacional de Controle da Tuberculose (NTCP). Isto talvez seja explicado pelas óbvias dificuldades encontradas durante o período da recente guerra civil e a larga disseminação do HIV (Nunes et al., 2005).

A tuberculose resistente é a principal preocupação mundial em relação à doença. O tratamento, quando tomado de forma irregular, faz com que os bacilos se tornem resistentes. Ela pode se constituir numa nova onda de doença, de difícil cura em todo o mundo.

1.2- Características microbiológicas do *Mycobacterium tuberculosis*

As micobactérias estão posicionadas taxonomicamente na Ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae. São bacilos finos, aeróbios, imóveis, não esporulados, não encapsulados e com grande quantidade de lipídeos na parede. À coloração de Ziehl-Nielsen, são álcool-ácido resistentes (Ministério da Saúde do Brasil, 1994).

O *Mycobacterium tuberculosis*, quando corado, apresenta-se isolado ou em pares, como bastonetes delgados, retos ou ligeiramente encurvados, de extremidades arredondadas, com comprimento que varia de 1 a 4 µm e 0,3 a 0,6 µm de espessura (Ministério da Saúde do Brasil, 1994).

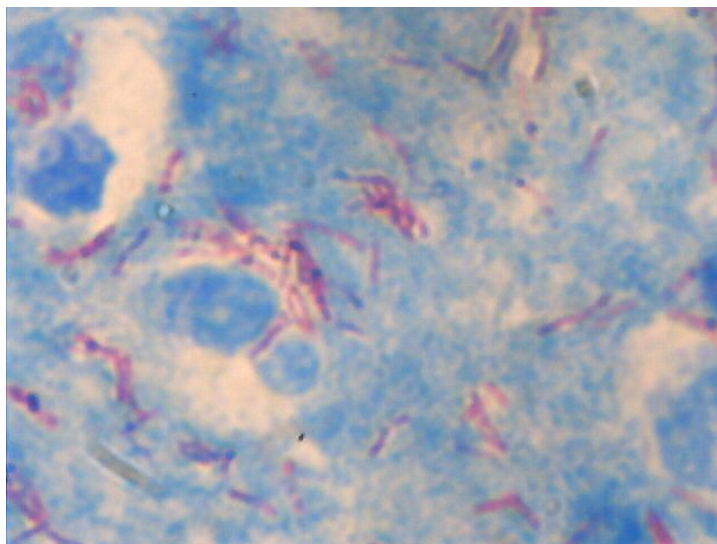


Figura 1- Coloração de Ziehl-Neelsen positivo para BAAR

As colônias típicas de *M. tuberculosis* são de cor creme, rugosas, desenvolvem-se na superfície do meio de cultura de Löwenstein-Jensen e não alteram a sua cor. A temperatura ótima de crescimento é 37°C (Ministério da Saúde do Brasil, 1994).



Figura 2 – Crescimento de *M. tuberculosis* em meio sólido de Löwenstein-Jensen

O tempo de geração é de 18 horas. Essa lentidão parece estar relacionada à absorção mais demorada dos nutrientes, devido à grande quantidade de lipídeos da parede (Ministério da Saúde do Brasil, 1994).

A cultura é o método de escolha para o diagnóstico das infecções provocadas por micobactérias. Uma vez cultivado, pode-se realizar testes específicos de identificação, além dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos (Ministério da Saúde do Brasil, 1994).

1.3- Métodos de biologia molecular aplicados à epidemiologia da tuberculose

O crescimento das taxas de morbidade por tuberculose no mundo renovou o interesse na compreensão da sua história natural. Um importante avanço no campo da pesquisa foi o desenvolvimento de técnicas genéticas que permitem a identificação precisa do *M. tuberculosis* e determinam o parentesco entre cepas individuais. (Burgos et al., 2002). Junto com a investigação epidemiológica clássica, essas técnicas podem contribuir sobremaneira para traçar a história dos surtos e epidemias de doença, revelando nexos pessoais e temporais e geográficos entre casos (Burgos et al., 2002).

A descoberta de elementos transponíveis e elementos repetitivos no “complexo *M. tuberculosis*”, em 1990, tem sido a base de diversos métodos que, tanto são utilizados na identificação, bem como na genotipagem desses microrganismos. Alguns são baseados na amplificação de seqüências repetidas de DNA, usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e outros investigam a posição, no genoma, de seqüências de inserção (IS's) (van Embden et al., 1993).

Essas técnicas permitiram, por exemplo, caracterizar grupos de *M. tuberculosis* que, por possuírem afinidade genômica, podem ser agrupados em famílias, como é o caso dos trabalhos acerca da família “W Beijing”. Levantamentos epidemiológicos desse tipo revelaram que os isolados dessa família distribuem-se por toda a Ásia e países da União Soviética (Bifani et al., 2002, Lillebaek et al., 2003). Já foram, inclusive, demonstrados na América do Norte provocando surtos de casos resistentes ao tratamento com isoniazida.

Um recente estudo no Vietnã revelou que os integrantes da família “Beijing” são emergentes nessa área e que são mais encontrados nos casos de transmissão ativa (pacientes jovens) do que nos casos de reativação endógena (pacientes idosos) (Anh et al., 2000).

O genoma do *M. tuberculosis* é conservado, como demonstram os trabalhos de genética evolucionar (Bifani et al., 2002, Young, 2003). Esses estudos também dão conta de que esse microrganismo adaptou-se recentemente à espécie humana.

Dentre as técnicas de genotipagem descritas, a que mais tem sido usada é demonstração da posição de seqüências de inserção IS6110 no genoma do *M. tuberculosis*. Conhecida como IS6110 RFLP, é a técnica que possui atributos que a qualificam como uma boa ferramenta a ser aplicada na epidemiologia da tuberculose. Permite, portanto, que se caracterizem surtos, epidemias, bem como definem o parentesco entre isolados, de modo a se prestar, também, a análises filogenéticas. Esse é o método internacionalmente padronizado para essas finalidades (van Embden et al., 1993).

No complexo *Mycobacterium tuberculosis*, em razão da proximidade genética das subespécies há um grau de polimorfismo de DNA associado ao DNA repetitivo como: seqüência de inserção (IS) e seqüências curtas de DNA repetitivo (DR). Existem identificadas quatro diferentes seqüências de inserção (IS) em cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, a saber: IS6110, IS1081, IS1547 e os IS-like elements (Thierry et al., 1990 Mariani et al., 1997 Fang et al., 1998 Kremer et al., 1999). A sequencia IS6110 pode ter uma grande variação de cópias no genoma, a IS1081 está presente de cinco a sete cópias, estando associada a um polimorfismo de DNA (Fang et al., 1998 e Kremer et al., 1999). As demais seqüências (IS1547 e IS like element) estão presentes em número de uma ou duas cópias por genoma (Kremer et al., 1999). O RFLP com a IS6110 é o método de tipagem com melhor padronização e o mais utilizado (Thierry et al., 1990 van Embden et al., 1993 van Soolingen et al., 1999).

Uma outra técnica de genotipagem em *M. tuberculosis* que vem sendo utilizada em complementação à IS6110 RFLP é a espoligotipagem. Ela é baseada na variabilidade da apresentação de seqüências conservadas e conhecidas de DNA em um locus cromossômico

particular, a região Direct Repeat (DR) (Soini et al., 2000). Através da espoligotipagem, por exemplo, Ramos et al., 1999 demonstraram a ocorrência de uma contaminação cruzada no laboratório de Patologia Clínica da Unicamp, que se deu pelo uso de uma solução de diluição contaminada com *M. tuberculosis*, empregada em uma das etapas do processamento de materiais clínicos. A técnica é simples e altamente reprodutível e tem sido usada para analisar cepas que à IS6110 RFLP só demonstrou-se possuir menos de seis seqüências em seu genoma (Kamerbeek et al., 1997).

A caracterização molecular do *M. tuberculosis* fornece resposta para as questões a respeito da transmissão em uma determinada área geográfica (Dahle et al., 2001; van Soolingen, 1995; Calusni et al., 2003).

1.4- Elemento transponível – seqüência de inserção IS6110

A descoberta do primeiro elemento transponível de DNA de uma micobactéria se deu em 1987. Desde então já foram descritos 46 elementos de inserção em 10 espécies de micobactérias. Desses, apenas seis se mostraram ativos e com capacidade de se transpor de um local do DNA da bactéria para outro. São identificados pela sigla IS (Insertion Sequence) e são subdivididos em famílias, de acordo com as características e espécies onde foram identificadas. Como alguns elementos de inserção são muito específicos de cada espécie, eles têm sido usados com freqüência, inclusive na prática clínica para uma identificação rápida (Smith, 1996).

A IS6110, encontrada no complexo *M. tuberculosis*, foi inicialmente descrita em 1989. Ela possui 1.355 pares de bases e pertence à família IS3. O número de cópias de IS6110 varia entre 0-25 e sua posição no cromossomo é variável entre diferentes isolados (Mostrom et al., 2002). Como consequência, a restrição com enzimas produz padrões que podem ser perfeitamente analisáveis com programas de computador. Além de polimórficos esses padrões são naturalmente estáveis quando se tratam de clones bacterianos e se prestam à análise epidemiológica (Mostrom et al., 2002).

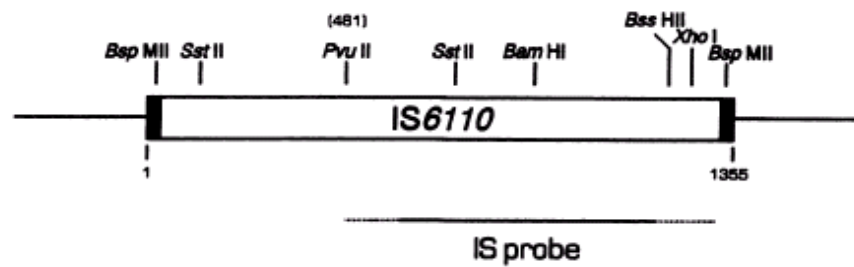


Figura 3- Elemento de inserção IS6110 do *M. tuberculosis* com 1.355 pb. Estão demonstradas as posições dos cortes de diversas enzimas de restrição. A enzima *PvuII* corta o elemento de inserção no par de base 461 (van Embden et al., 1993).

2 – OBJETIVO

- Caracterizar os perfis genotípicos, obtidos através da restrição e pesquisa da seqüência de inserção IS6110, de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes provenientes de Moçambique, África.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Casuística

Foram estudadas culturas de *Mycobacterium tuberculosis*, isoladas do escarro de pacientes HIV positivos, maiores de 14 anos, de ambos os sexos e que residiam em Maputo, Moçambique, atendidos no período de 2002 a 2004. O estudo foi realizado em dois grandes hospitais: Hospital Central de Maputo (HCM) e o Hospital Geral de Machava. O primeiro é referência na região sul do país e o segundo referência nacional para casos de tuberculose. As culturas foram realizadas em meio Löwenstein-Jensen no laboratório de referência de Tuberculose da Faculdade de Medicina Eduardo Mondlane e enviadas ao Laboratório de Patogênese Bacteriana e Biologia Molecular da UNICAMP – Campinas SP, obedecendo às normas de segurança estabelecidas internacionalmente.

3.2- Identificação dos isolados

A identificação foi feita através do PRA-PCR. Esse método consiste na análise de Padrão de Restrição (PRA) de produtos da amplificação de trecho de gene *hsp65* (Devallois et al., 1997). O DNA foi extraído a partir do crescimento em meio sólido de Löwenstein Jensen. Com o auxílio de uma alça bacteriológica foram recolhidas células bacterianas que foram suspensas em 500µl de Tampão TE (Tris-HCl pH 8.3, 1 mM EDTA) adicionado de 1% Triton X-100. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 100°C por 10 minutos e resfriados a -20°C por 20 minutos, após. Esse procedimento foi repetido por três vezes. Depois de centrifugados a 10000 rpm, os sobrenadantes foram congelados a -20° para utilização posterior.

3.2.1 - Amplificação do *hsp65*

A amplificação do gene *hsp65* e a restrição dos fragmentos amplificados seguiu o protocolo proposto por Telenti et al, 1993.

Adicionou-se 5 µl do sobrenadante (DNA extraído) obtido na etapa anterior a uma solução de volume final 50µL contendo: dNTPs 200µM, TaqPolymerase 1,25U, MgCl₂ 1,5mM, Primers TB11: 5'- ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT – 3' e TB12: 5' - CTT e volum GTC GAA CCG CAT ACC CT – 3'. A amplificação é feita com os seguintes tempos e temperaturas: 94°C – 5'; 45 ciclos com 94°C – 1', 65°C – 1', 72°C – 1' e extensão final com 72°C – 10'. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% a 100v por 10 minutos, corados com brometo de etídio.

3.2.2 - Digestão pela *BstEII*

A restrição é realizada preparando uma mistura contendo 5U da enzima BstEII (New England BioLabs, Schwalbach, Germany), 10 µL do sobrenadante (DNA extraído), 2, 5µL do tampão, 0,5µL de BSA e água num volume total de 25µL. Incubada a 60°C por 90 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 3% a 100V por 90 minutos e corados pelo brometo de etídio.

3.2.3 - Digestão pela *HaeIII*

A restrição é realizada preparando uma mistura contendo 5U da enzima HaeIII (New England BioLabs, Schwalbach, Germany), 10 µL do sobrenadante (DNA extraído), 2,5µL do tampão e água no volume total de 25µL. Incubada a 37°C por 90 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 3% a 100V por 90 minutos e corados pelo brometo de etídio.

3.2.4- Análise do gel após a digestão pelas enzimas

O cálculo do tamanho das bandas em pares de bases foi feito com o auxílio do programa Kodak Digital Science[®] - 1D Image Analyses Software Windows V 3.0 (New Jersey – U.S.A.). Em todas as análises, foram utilizados padrões H37Rv (*M. tuberculosis*) e IWGMT (*M. avium*) e água (controle de qualidade). O tamanho dos fragmentos de restrição obtidos foram comparados a padrões disponíveis no endereço internet: <http://app.chuv.ch/prasite>

M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

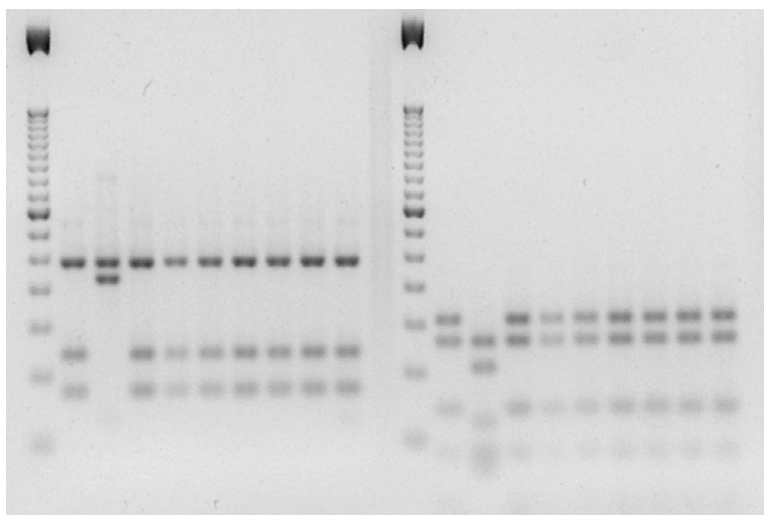


Figura 4 - Identificação das cepas de *M. tuberculosis* pelo PRA-PCR. M: marcador de 50 pb (Invitrogen[®]); Canaleta 2-10: *BstEII*; Canaleta 12-20: *HaeIII*. Canaleta 3 e 13: *Mycobacterium avium*; Canaleta 2 e 12: H37Rv; Canaleta 4-10 e 14-20: *Mycobacterium tuberculosis*; Canaleta 11 e 21: controle

3.3 - Extração do DNA genômico.

A parte inicial do trabalho foi realizada no setor de Micobactérias da DPC/HC/UNICAMP até não oferecer riscos de contaminação, utilizando equipamento de segurança biológica BII e as etapas seguintes foram realizadas no Laboratório de Patogênese Bacteriana e Biologia Molecular da FCM/UNICAMP.

O método utilizado foi o de van Embden et al (1993). Após o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis* em meio sólido de L-J foi colocada uma alçada em 400 µl de TE 1X (Tris/ HCl 10mM, EDTA 10mM, pH 8,0) em microtubo de polietileno para microcentrífuga (1,5 ml) e, a seguir, as células foram mortas pelo calor por 20 minutos a 80°C. Foi adicionado 50 µl de lisozima (10 mg/ml) e incubado por um período de 12 horas a 37°C (Thermomixer, Eppendorf). Em seguida, foi adicionado 70 µl de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 10% e 5 µl de Proteinase K sob vigorosa agitação. Logo após foi adicionado 100 µl de solução de 10g% de Brometo de N-cetil-N,N,N – trimetil amônio (CTAB) e NaCl 4,1 g% em água e pré aquecida a 65°C , também agitado vigorosamente até que o líquido adquirisse um aspecto branco leitoso, sendo depois aquecido a 65°C sob agitação. (Thermomixer, Eppendorf), por 10 minutos. Procedeu-se, então, à separação das proteínas, adicionando-se 750 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugação por cinco minutos a 12000 rpm. A fim de se precipitar o ácido nucléico, foi adicionado aos novos microtubos 0,6 vol. (450 µl) de Isopropanol 100%. As amostras foram mantidas a -20°C por 1 hora e, a seguir, centrifugadas (12000 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado em 1 ml de etanol 70% gelado. Foi repetida a centrifugação e o descarte do sobrenadante para a secagem do precipitado à temperatura ambiente. Por fim, os sedimentos foram ressuspensos em 30 µl de tampão TE 1X pH 8,0 e estocado a -20°C.

3.3.1 - Estimação da concentração do DNA

O DNA extraído foi diluído a 1:100 e quantificado por leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro gene-QuantII (Pharmacia Biotech®) no comprimento de onda $\lambda = 260\text{nm}$. Foram utilizadas as soluções de DNA com concentrações entre 0,2 µg/µl – 2,0 µg/µl.

3.3.2 - Eletroforese do DNA extraído

Para verificar a sua integridade, o DNA extraído foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% acrescido de brometo de etídio (0,5µl/ml) para a visualização. A corrida eletroforética foi realizada com tampão TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM/ EDTA 2,5 mM/ pH 8,0) e submetidas a uma corrente de 100V por 20 minutos. O gel foi fotografado em câmara Polaroid , empregando a luz ultravioleta.

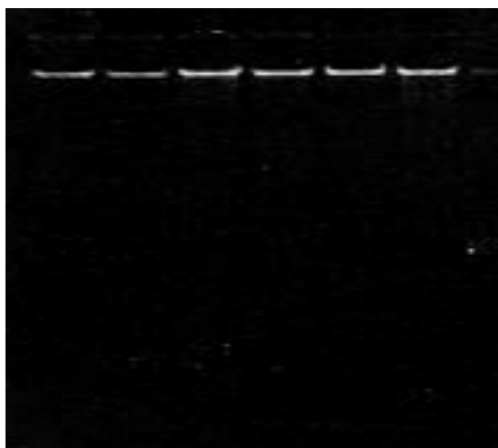


Figura 5 – Extração de DNA. Corrida eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/ml.

3.4 - Digestão do DNA genômico por enzima de restrição

Os DNAs extraídos foram digeridos com a enzima de restrição *PvuII* (Life Technologies®). A digestão foi realizada num volume total de 20µl, nas seguintes condições: 2µl do tampão 10X da enzima; 4,5µg de DNA extraído; 1µl da enzima *PvuII* (10U/µl) e completado com água ultra-pura e estéril. Os microtubos de polietileno foram agitados manualmente e centrifugados por um minuto (12.000 rpm) e incubados em banho-maria à 37°C por quatro horas. A seguir, foi adicionado 5µl de azul de bromofenol 10X, agitados manualmente e centrifugados por um minuto. A digestão completa dos DNAs foi observada por corrida eletroforética (utilizando-se 5µl do DNA digerido) em gel de agarose 0,8%, com brometo de etídio (0,5µg/ml) (80v por 40 minutos em tampão TBE 1X) . A seguir, as amostras de DNA foram conservadas a -20°C.

3.5 - Eletroforese

Foi preparado um gel de agarose 1% e foi utilizada, como marcador externo a cepa de referência MT 14323. Foi aplicado 5 μ l do marcador eletroforético nas 1, 11 e 21 canaletas nos demais os DNAs digeridos. A eletroforese foi realizada a 3.2 V/cm (100V) por mais ou menos 5 a 10 minutos em seguida a voltagem foi diminuída para 32V e o gel correu por mais ou menos 20 horas com tampão TBE 1X. Foram verificadas as migrações no gel com UV e em seguida fotografado.

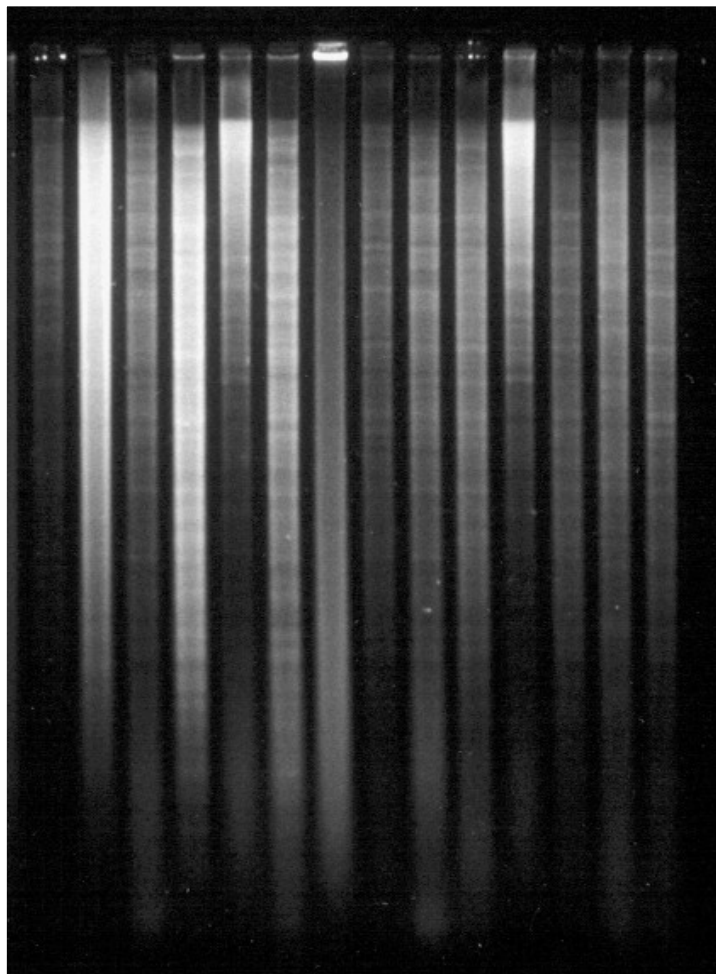


Figura 6 - Corrida eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,5 μ g/ml, após 20h

3.6 - Southern Blotting

3.6.1 - Preparação do gel para Southern Blotting

Após a corrida eletroforética, o gel foi submetido à luz UV até eliminação total do brometo de etídio e tratado com HCl 0,25M por 10 minutos para a depurinação dos fragmentos de DNA, a fim de aumentar a velocidade e eficiência da transferência. A seguir, o gel foi lavado com água destilada estéril por 10 segundos e mergulhado em solução de NaOH 0,4M por 20 minutos, para a desnaturação da dupla fita de DNA. Depois desse período, o gel foi lavado com água destilada estéril e solução de NaOH 0,4M por 20 minutos. O gel foi retirado da solução de desnaturação e montado o sistema para a transferência do DNA do gel para a membrana de nylon polarizada (Hybond N+/Amersham Pharmacia Biotech[®]). Para tal, num recipiente de vidro contendo solução recém preparada NaOH 0,4M, foi colocado um suporte para o gel e sobre esse, estendido uma tira de papel 3MM (Whatman[®]) da mesma largura que o gel e comprimento suficiente para ficar submersa na solução salina, formando uma ponte. Sobre a ponte foram colocados dois papéis 3MM (Whatman[®]) umedecidos em solução NaOH 0,4M e o gel. Sobre o gel foi colocada a membrana umedecida em solução NaOH 0,4M com uma folha de papel 3MM (Whatman[®]). Por último foram colocadas várias folhas de papel de germinação de semente e sobre elas uma placa de vidro e sobre esta um peso de aproximadamente 500g. A transferência deu-se por 24 horas. Passado esse período o sistema foi desmontado e retirada a membrana de nylon.

3.6.2 - Tratamento da membrana depois do Southern Blotting

A membrana foi lavada com solução SSC 5X por cinco minutos. A seguir, o DNA foi fixado na membrana em UV a 200J (Crosslink-Hoefer[®]). A membrana foi usada diretamente na hibridização ou estocada a 4°C em saco plástico, para utilização posterior.

3.7 - Construção da sonda molecular

3.7.1 - Amplificação do DNA pela reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A sonda foi obtida pela reação de PCR utilizando-se dois oligonucleotídeos iniciadores (“primers”), propostos por van Embden et al., (1993):

INS-1 (5'- CGTGAGGGCATCGAGGTGGC)

INS-2 (5' -GCGTAGGCGTCGGTGACAAA)

Esse par de iniciadores é responsável pela amplificação de um fragmento de DNA de 245 pb, interno à seqüência *IS6110*.

Foram utilizados os seguintes volumes/concentração de reagentes para um volume final de 50 µl de reação: 30 µ DNA alvo extraído (H37Ru), 5 µl tampão PCR 10 x 4 µl dNTP (2,5 mM para cada dNTP), 5 µl INS-1 (50 ng/µl), 5 µl de INS-2 (50 ng/µl), 0,25 µl Taq polimerase (5U/µl), 0,75 µl de água.

Os microtubos para microcentrífuga, contendo a mistura completa, foram introduzidos no termociclador para efetuar a amplificação, segundo as seguintes condições: três minutos a 96°C para a desnaturação inicial, 30 ciclos de um minuto a 96°C para a desnaturação, um minuto a 65°C para anelamento dos “primers” e um minuto a 72°C para extensão da fita síntese de DNA, e extensão final dos produtos por seis minutos a 72°C.

A amplificação foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1% (50V por duas horas), aplicando-se na primeira canaleta do gel 1 µl do marcador de 100 pb (Life Technologies®) e 1µl do azul de bromofenol 10x e nas demais canaletas 1 µl do produto de DNA e 1 µl do azul de bromofenol 10x.

A purificação foi realizada de acordo com o kit QIAquick (Qiagen®). Os fragmentos purificados foram quantificados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e, nas canaletas paralelas foram adicionado o DNA Quantification Standards (Life Technologies®) nas concentrações padronizadas. Os produtos de PCR purificados foram diluídos até a concentração de 10 ng/µl e estocados a -20°C até seu uso. A sonda obtida foi diluída com água ultra pura, obtendo-se uma concentração de 10ng/µl.

3.7.2 - Marcação da sonda

A marcação de 30µl (30ng) da sonda IS6110 obtida através de amplificação por PCR foi feita para uma reação de quimio-luminescência, utilizando-se o Kit ECL - “direct nucleic acid labelling and detection systems” (Amersham Pharmacia Biotech[®]), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. A sonda foi desnaturada por ebulição por cinco minutos e, a seguir, resfriada em gelo, imediatamente, por um minuto, centrifugada brevemente a 12.000 rpm e adicionada de igual volume do reagente de marcação. Após agitação manual, foi adicionado igual volume de glutaraldeído. A solução foi novamente centrifugada e incubada por 10 minutos a 37°C, e foi utilizada na hibridização.

3.8 - Hibridização

A membrana de nylon foi enrolada sobre si mesma e colocada na garrafa de hibridização juntamente com 50mL do tampão ECL de hibridização (pré - aquecido) a 42°C por 1 hora. Nesse momento, a sonda marcada foi adicionada diretamente à solução de hibridização dentro tubo e a membrana hibridizada por 24 horas a 42°C em forno de hibridização (Amersham Pharmacia Biotech[®]) sob rotação (6 rpm). Depois desse período, o tampão de hibridização foi descartado e a membrana lavada por duas vezes com 50mL do tampão primário de lavagem (pré – aquecido a 42°C) diretamente à garrafa de hibridização, e mantendo a mesma temperatura por 20 minutos. Após, o tampão de lavagem foi descartado. A seguir, a membrana foi colocada numa bandeja de plástico com tampão secundário de lavagem (SSC2X), até total cobertura e incubando a temperatura ambiente, por cinco minutos, sob agitação; o tampão foi descartado e esta etapa foi repetida. A membrana foi retirada e seca à temperatura ambiente, em papel 3MM (Whatman[®]).

3.9 - Lavagem da membrana depois da hibridização

O tampão de hibridização foi descartado, e adicionado 50-100ml do tampão de lavagem (uréia) a 42°C por 20 minutos. Em seguida o tampão de lavagem foi descartado e repetida a operação novamente. O tampão primário foi descartado e a membrana foi colocada na bandeja com tampão secundário de lavagem (2X SSC) 500 ml, incubado à temperatura ambiente por cinco minutos, em seguida agitado por no máximo 30 minutos. O tampão foi descartado e a operação repetida.

3.10 - Detecção

Esta etapa foi realizada em câmara escura, apenas na presença de luz vermelha. Para a detecção foi utilizada o Kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech®), contendo os reagentes de detecção um e dois. Foi misturado volume igual de cada reagente de detecção. A membrana foi colocada em uma bandeja de plástico e imersa nos reagentes. O excesso de reagentes foi retirado e a membrana colocada em um saco plástico vedado. A membrana foi exposta a filme radiográfico (Hyperfilm - Kodak®) por 10-120 minutos. O filme foi revelado em equipamentos apropriados no Departamento de Farmacologia FCM/UNICAMP. A membrana foi estocada em sacos plásticos a 4°C.

3.11- Análise dos Perfis Moleculares

Os resultados dos perfis moleculares obtidos pela técnica de RFLP foram analisados com o auxílio do Programa BioNumerics 4.50 Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium no laboratório de Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) sob orientação do Prof. Dr. Phillip Noel Suffys e colaboração do mestrando Diogo dos Santos Netto.

4 – RESULTADOS

Durante o período de estudo de outubro de 2002 a agosto de 2004, foram incluídos 506 pacientes infectados pelo HIV. Desses, 335 tiveram cultura do escarro positiva e em 315 delas foi identificado o *M. tuberculosis*. Foram genotipados 158 isolados com o auxílio da técnica da RFLP, utilizando a seqüência de inserção IS6110. As populações de pacientes incluídos no estudo podem ser vistas na **Figura 7**.

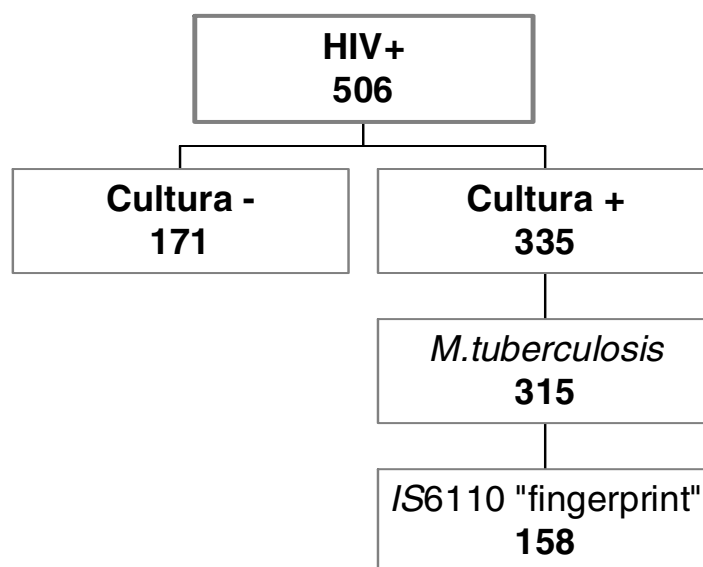


Figura 7- Populações de indivíduos incluídos no estudo.

Da população de estudo, (=158 casos), 103 (65%) pacientes eram do sexo masculino e 55 (35%) do sexo feminino.

Um exemplo dos padrões genotípicos encontrados pode ser visto na **Figura 8**.

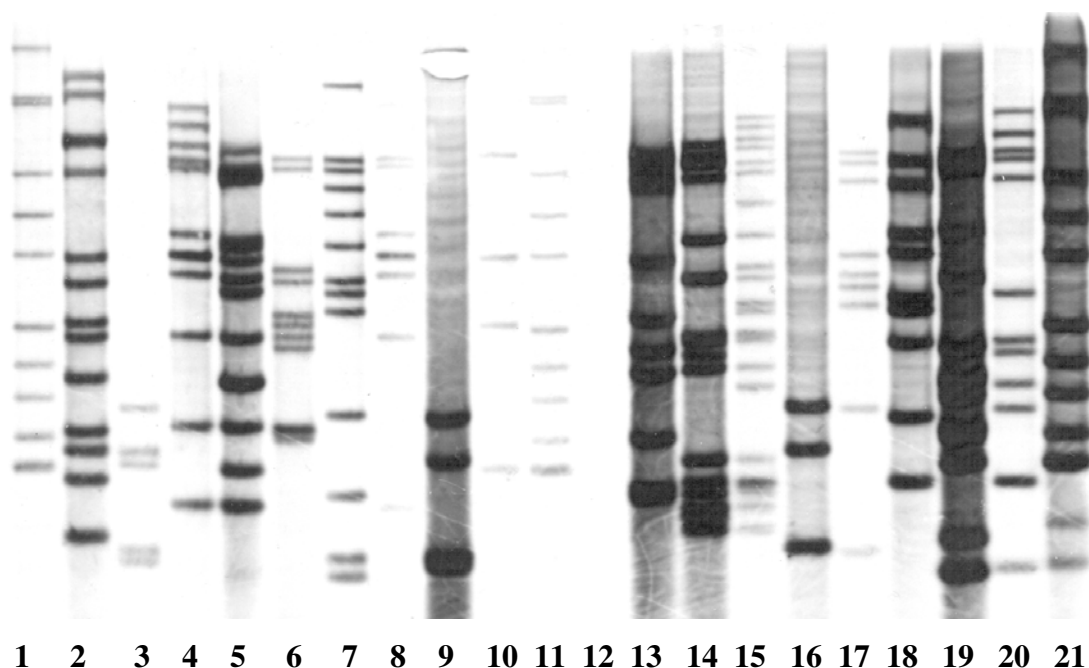


Figura 8 - Exemplo de genótipos obtidos no estudo. Colunas 1, 11 e 21 - cepa de referência (MT 14323). Colunas 2 a 10 e 12 a 20 isolados estudados.

Foram observados 113 padrões diferentes em 124 isolados analisados, excluídos os 34 que apresentaram menos de seis seqüências *IS6110*. Desse total de isolados com padrões genotípicos analisáveis (n=113), 103 isolados tinham genótipos particulares. Outros 21 isolados estavam agrupados em “clusters”. Nove deles com dois isolados cada e um com três isolados. Um exemplo de um dos “clusters” encontrados pode ser visto na **Figura 9**.

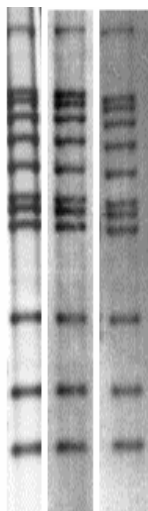


Figura 9 – Exemplo de um dos “clusters” encontrados.

O número de cópias de *IS6110* observadas nesses genomas variaram entre uma e 18 bandas, como pode ser observado no **Gráfico 1**. As cepas com 12 seqüências *IS6110* predominaram. Nas amostras analisadas, observaram-se padrões genotípicos com menos de seis seqüências *IS6110* (n=34; 21.5%) e que, portanto, foram excluídas da análise do coeficiente de similaridade.

O número de seqüências de inserção observadas nos genomas variaram de 1 a 18 bandas como segue:

a) quatro isolados com uma banda, b) três isolados com duas bandas, c) nove isolados com três bandas, d) dez isolados com quatro bandas, e) oito isolados com cinco bandas, f) dois isolados com seis bandas, g) nove isolados com sete bandas, h) quinze isolados com oito bandas, i) dez isolados com nove bandas, j) dezesseis isolados com 10 bandas, k) quatorze isolados com 11 bandas, l) vinte e seis isolados com 12 bandas, m) quatorze isolados com 13 bandas, n) seis isolados com 14 bandas, o) quatro isolados com 15 bandas, p) seis isolados com 16 bandas, q) dois isolados com 18 bandas.

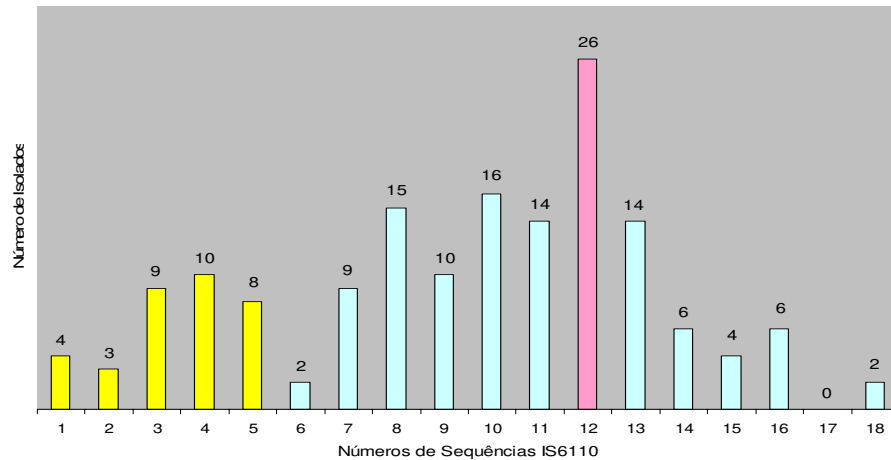


Gráfico 1– Distribuição dos isolados, segundo o número de seqüências IS6110 encontradas

Foram identificados dez “clusters”, compostos como se segue: a) “cluster” seis com dois pacientes, b) “cluster” oito com dois pacientes, c) “cluster” 10 com dois pacientes d) “cluster” 11 com dois pacientes e) “cluster” 12A com três pacientes, f) “cluster” 12B com dois pacientes, g) “cluster” 12C com dois pacientes, h) “cluster” 12D com dois pacientes, i) “cluster” 13 com dois isolados e j) “cluster” 16 com dois isolados. Essa denominação foi arbitrariamente adotada. No gráfico 2 pode-se observar a distribuição do número de seqüências observadas nos isolados, bem como os “clusters” caracterizados.

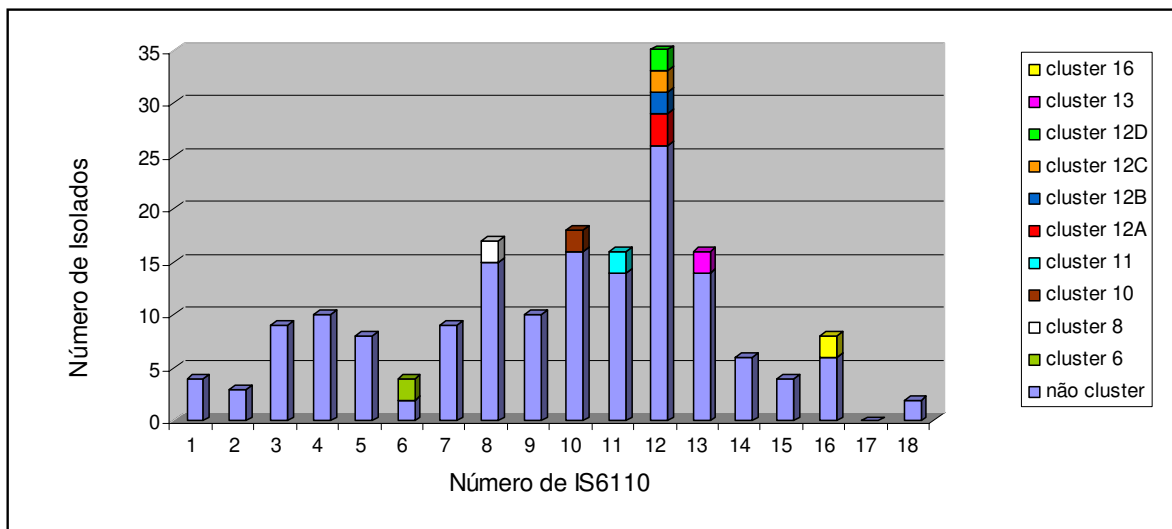


Gráfico 2 – Distribuição dos isolados, segundo o número de seqüências IS6110 e seus respectivos “clusters” encontrados.

Os diversos padrões genotípicos reunidos em “clusters” apresentaram 100% de homologia. Os isolados que exibiram menos do que seis seqüências, na sua maioria, se apresentaram em conglomerados. Baseado no coeficiente de similaridade, 85% dos isolados, exibiram mais do que 65% de homologia (**Figura 10**).

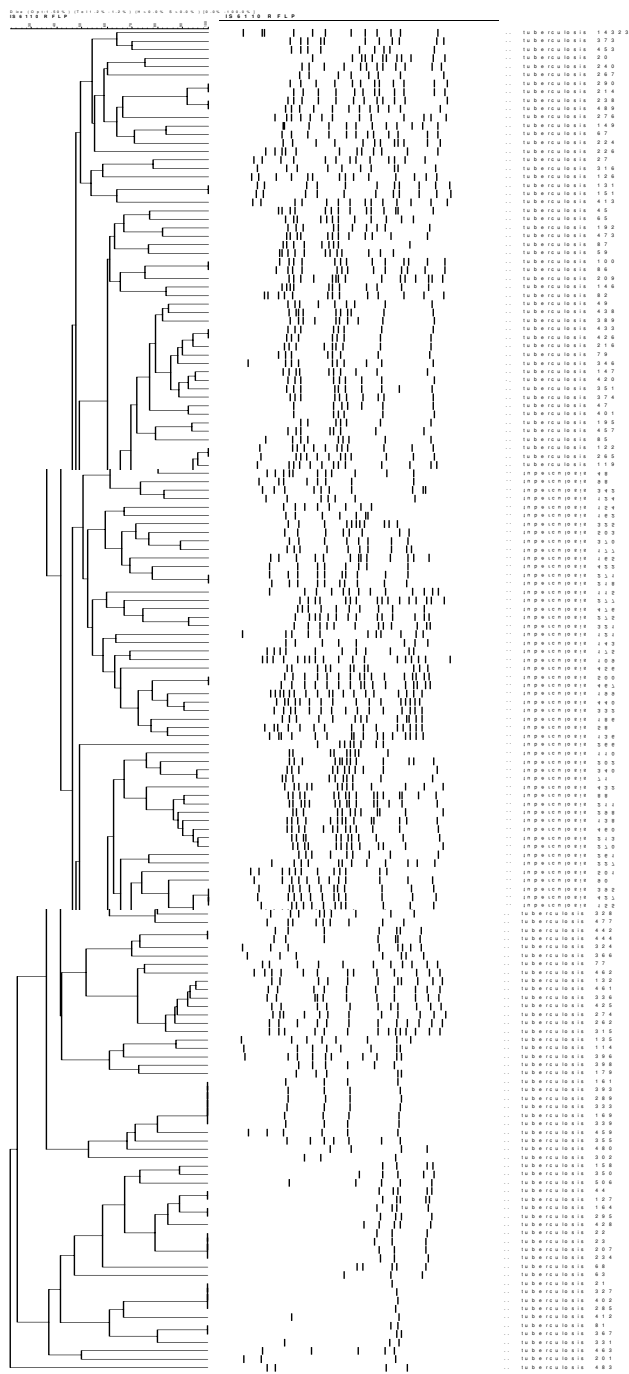


Figura 10 – Análise filogenética (dendrograma) dos isolados genotipados (n = 158), segundo o padrão do RFLP encontrado

5 – DISCUSSÃO

Os métodos de genotipagem de microrganismos com fins epidemiológicos, de fato, representaram um avanço na compreensão da história natural das doenças infecciosas. No caso da tuberculose, a descrição de um método como a caracterização do número e da posição, no genoma de *M. tuberculosis*, da seqüência de inserção IS6110 (IS6110 RFLP), foi fundamental e tem sido uma ferramenta valiosíssima em estudos desse tipo. Essa abordagem revela nexos temporais, pessoais e geográficos não acessíveis à investigação epidemiológica clássica (Lambregts-van Weezenbeek et al., 2003).

São abundantes as recomendações e padronizações dessa técnica, bem como ela tem sido empregada, na prática, em programas bem formulados de controle da tuberculose (McConkey et al., 2002; Kimerling et al, 1998).

Há também uma profusão de relatos na literatura dando conta de perfis genotípicos e de caracterização de isolados, segundo o número dessas seqüências, de forma a constituir bancos de dados, perfeitamente compatíveis, já que há padronização da execução e análise dessas informações. O emprego de programas de computador destinados ao armazenamento e comparação desses perfis genotípicos torna rápida essa tarefa.

Essas informações, geralmente, vêm de locais em que existem recursos para tal. Embora dotada de reprodutividade e utilidade inquestionáveis, ela é uma técnica cara e trabalhosa. Portanto, não há muitas informações acerca desses dados provenientes de países com baixo nível de desenvolvimento. Em Moçambique há um único estudo (Caugant et al., 1995) em que foram genotipados 66 isolados de *M. tuberculosis*, com o auxílio do IS6110 RFLP. Trata-se de uma investigação destinada a relacionar epidemiologicamente cepas resistentes à rifampicina.

Há restrições, entretanto, ao seu emprego. A principal é a não existência dessa seqüência em alguns isolados. Em 1993, van Soolingen et al, relataram pela primeira vez o encontro de um isolado proveniente da Índia, em que ela não foi demonstrada. Ainda, Radhakrishan et al. 2001, na Índia, demonstrou que, de um total de 80 isolados, 19 não possuíam a seqüência IS6110. Essa ocorrência, entretanto, quando considerados os dados mundiais é considerada rara, pois uma das características dos microrganismos do complexo *M. tuberculosis* é a existência dessas seqüências em seu genoma e há, inclusive, métodos de

identificação que se baseiam na sua amplificação. Uma das explicações para esses achados da Índia é o isolamento geográfico de suas populações e a possível evolução dos isolados, a partir de poucos ancestrais. Neste trabalho, todos os isolados genotipados possuíam a seqüência IS6110.

Uma outra limitação desse método é a existência de poucas seqüências em um genótipo particular. Considera-se não haver polimorfismo suficiente que permita o agrupamento em clones quando os isolados, mesmo possuindo localização idêntica das seqüências, exibem menos do que seis bandas. Também, em isolados de pacientes da Índia, Radhakrishnan 2001, relatou a ocorrência de 31 casos que tinham apenas uma cópia da IS6110 e oito que tinham entre duas e cinco cópias, dentre 80 isolados testados. Das et al. 1995, analisando isolados recuperados de pacientes de Madras, Índia, obtiveram 40% de isolados sem, ou com uma só cópia da seqüência IS6110. Narayanan et al., 2002, também estudando pacientes do sul da Índia, encontraram 41% de isolados com apenas uma seqüência IS6110. No Brasil, Suffys et al. 2000, relataram que 17% de 219 cepas provenientes de várias regiões e investigadas com essa técnica exibiam menos do que seis cópias. Embora o número de isolados analisados não seja suficiente de modo a permitir inferências aplicáveis ao total de casos observados em Moçambique, esses resultados permitem dizer que esse método pode ser aplicado com finalidades epidemiológicas e que em um número razoável de casos, uma segunda técnica, como a espoligotipagem, deverá ser realizada para o eventual relacionamento genotípico entre isolados que exibem menos do que seis cópias da IS6110.

Há diferenças entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, quando se compara o genótipo obtido com a técnica do IS6110 RFLP. Já que essa técnica também pode ser utilizada para traçar a filogenia de grupos isolados, é possível verificar-se o relacionamento genético de um grupo de cepas estudadas. Assim é que, comparando-se os genótipos de isolados obtidos na Tanzânia (Gillespie et al, 1995), por exemplo, verifica-se que há uma considerável homologia entre esses perfis. Em trabalho semelhante, van Soolingen et al. 1991 relata que entre isolados obtidos na Holanda há considerável diversidade. A possível explicação para esse fato é que nos locais onde ocorre um número grande de casos, também há uma transmissão intensa de microrganismos entre os

indivíduos, o que equivale a dizer que esses organismos têm parentesco próximo. Nas áreas de baixa prevalência, a maioria dos casos de doença corresponde a reativações causadas, portanto, por microrganismos não relacionados. É lógico que, nos surtos, ocorram eles em países desenvolvidos ou não desenvolvidos e a homologia dos isolados é completa. Os isolados estudados neste trabalho, segundo pode-se verificar no dendrograma apresentado, possuíam relacionamento genotípico próximo, pois a maioria dos isolados exibe mais que 65% de homologia, confirmando o argumento apresentado anteriormente. Moçambique é um país de baixo nível de desenvolvimento, de poucos recursos e elevada incidência de tuberculose.

Em análises genotípicas têm sido também utilizadas para documentar a distribuição global de cepas de *M. tuberculosis*. Em um estudo realizado na Holanda, Borgdorff et al. 1998, demonstraram que 17% de casos de tuberculose registrados podiam ser relacionados a casos índice de outras nacionalidades. Em estudo realizado no Brasil, Calusni et al. 2003, comparando com os genótipos obtidos de isolados de pacientes de Campinas, São Paulo, com os de um banco de dados dos Estados Unidos, mostraram que haviam isolados com genótipos idênticos aos isolados em cidades americanas da fronteira com o México e na cidade de Nova Iorque. Ao contrário, Hermans et al. 1995, na Holanda, examinando cepas provenientes da Etiópia, Tunísia e da própria Holanda, não encontraram um número significativo de isolados de genótipo idêntico, indicando um isolamento estrito dos reservatórios bacterianos nesses países. Neste estudo, os genótipos obtidos não foram comparados com outros bancos de dados internacionais, porém, tendo introduzido essa técnica no local e com a coleta de um maior número de isolados, tais estudos serão possíveis.

Populações de indivíduos com características próprias que facilitam a transmissão da tuberculose, também têm sido analisadas com o auxílio do IS6110 RFLP. Ferrazolli et al. 2000, mostraram que, em isolados multiresistentes, provenientes de pacientes infectados pelo HIV, têm uma maior frequência de “clusters”, indicando a transmissão recente. Em trabalho semelhante, Ivens-de-Araújo et al. 1998, verificaram também a maior frequência de “clusters” em pacientes portadores do HIV. Nos pacientes estudados neste trabalho, todos HIV positivos a frequência de isolados em “clusters” foi de

cerca de 17%, sugerindo também a transmissão da tuberculose nesses casos. Entretanto este trabalho não se destinou a caracterizar surtos ou mesmo descrever a história da doença no cenário de Moçambique. O número de isolados testados é reduzido em relação à expectativa do total de casos, de forma que não se permitem inferências sobre a ocorrência da tuberculose naquele país.

6 – CONCLUSÃO

- Os perfis genotípicos obtidos com a técnica IS6110-RFLP aplicada a isolados de *M.tuberculosis*, obtidos de Maputo, Moçambique, mostraram um significativo polimorfismo, permitindo a caracterização de 113 padrões distintos.
- Foi possível o agrupamento de isolados de 10 “clusters” distintos, um com três isolados e nove com dois.
- Foram encontradas 21,5% cepas com menos de cinco cópias de IS6110, impossibilitando a análise de similaridade entre os genótipos. Um segundo marcador genético deve ser utilizado nesses casos.
- A análise do polimorfismo de fragmentos de restrição, utilizando como marcador a seqüência IS6110, pode ser feita em isolados de Moçambique para o estudo epidemiológico de casos de tuberculose. Entretanto, o número significativo de casos de isolados com menos de cinco cópias dessas seqüências exige o emprego de um segundo marcador genotípico para tais estudos.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ait- Khaled N, Enarson DA. Tuberculosis a manual for medical students. WHO/CDC/TB. 272, 1999.

Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, Lan NT, van Gorkom T, Kremer K, van Soolingen D. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 2000; 6: 302-5.

Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.* 2002; Jan. 10 (1): 45-52.

Borgdorff MW, Nagelkerke N, van Soolingen D, de Haas PE, Veen J, van Embden JD. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting. *Am. J. Epidemiol.* 1998; 147 (2): 187-95.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: Centro de Referência Prof. Hélio Fraga; 2 ed, 1994.

Burgos MV, Pym AS. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur. Respir. J. Suppl.* 2002; Julho 36: 54s-65s.

Calusni ALR, Roscani GN, Villares MCR, Soini H, Graviss EA, Ramos MC. IS6110 restriction Fragment Length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Patients with Pulmonary Tuberculosis in Campinas, Brazil. Evidence of Intercontinental distribution of Strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2003; Vol 98 (5): 665-658.

Caugant DA, Sandven P, Eng J, Jeque JT, Tonjum T. Detection of rifampin resistance among isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mozambique. *Microb. Drug. Resist.* 1995 winter 1 (4): 321-6.

Das S, Paramasivan CN, Lowrie DB, Prabhakar R, Narayanan PR. IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, south India. *Tuber. Lung. Dis.* 1995; 76 (6): 550-4.

Dahle UR, Sandven P, Heldal E, Caugant DA. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Norway. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:1802-7.

Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of *Mycobacterium* to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J. Clin. Microbiol. 1997; 35 (11): 2969-73.

Fang Z, Morrison N, Watt B, Doing C, Forbes KJ. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strain. J. Bacterial. 1998; 180: 2102-09.

Ferrazoli L, Palaci M, Marques LR, Jamal LF, Afiune JB, Chimara E et al. Transmisión de tuberculosis in a endemic urban setting in Brazil. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2000; 4 (1): 18-25.

Gillespie SH, Kennedy N, Ngowi FI, Fomukong NG, Al-Maamary S, Dale JW. Restriction fragment length polymorphism analysis of mycobacterium tuberculosis isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Northern. Trans. R. S. Trop. Med. Hyg. 1995; 89: 335-38.

Hermans PWM, Messadi F, Guebrexabher H, van Soolingen D, Haas PEW, Heersma H, et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. J. Infect. Dis. 1995; 171 1504-13.

<http://app.chuv.ch/prasite>

Ivens-de-Araujo ME, Fandinho FC, Werneck-Barreto AM, Goncalves-Veloso V, Grinstetejn B, Lourenco MK et al. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with and without AIDS in Rio de Janeiro. Braz. J. Med. Biol. Res. 1998; 31 (3): 369-72.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 1997; 35 (4): 907-14.

Kimerling ME, Benjamin WH, Loh KH, Curtis G, Dunlap NE. Restriction fragment length polymorphism screening of *Mycobacterium tuberculosis* isolates: population surveillance for targeting disease transmission in a community. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 1998; (8): 655-62.

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PWM, Martin C et al. 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. 1999; 37: 2607-18.

Lambrechts-van Weezenbeek CS, Sebek MM, van Gerven PJ, de Vries G, Verver S, Kalisvaart NA et al. Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprinting surveillance in the Netherlands: 6 years experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2003; 7 (12 Suppl 3): 463-70.

Leung AN. Pulmonary tuberculosis: The essentials. Radiology. 1999; 210: 307-322.

Lillebaek T, Andersen AB, Dirksen A, Glynn JR, Kremer K. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype. Emerging. Infectious. Diseases. 2003; 9 (12): 1553-57.

Mac A A, Gloyd S, Perdigão P, Noya A, Scarlal J, Kreiss J. Characteristics of drug resistance and HIV among tuberculosis patients in Mozambique. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2001;5 (10):894-902.

Mariani F, Piccolella E, Colizzi V, Rappuoli R, Gross R. Characterization of an IS-like element from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Gen. Microbiol. 1997; 35:273-7.

McConkey SJ, Williams M, Weiss D, Adams H, Cave MD, Yang Z et al. Prospective use of molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by use of restriction fragment-length polymorphism in a public tuberculosis-control program. Clin. Infect. Dis. 2002; 34 (5): 612-19.

MOÇAMBIQUE. Ministério da Saúde. Programa Nacional das DST/SIDA em 1994.

Mostrom P, Gordon M, Ridell M, Rastogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002; 8 (11): 694-04.

Narayanan S, das S, Garg R, Hari L, Rao VB, Frieden TR et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in a rural area of high prevalence in South India: implications for disease control and prevention. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40 (12): 4785-88.

Nunes EA, Capitani EM, Coelho E, Joaquim OA, Figueiredo RO, Cossa AM, et al. Patterns of anti-tuberculosis drug resistance among HIV-infected patients in Maputo, Mozambique, 2002-2003. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2005; 9 (5): 494-500.

Radhakrishnan I, KMY, Kumar RA, Mundayoor S. Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 1683.

Ramos MC, Soini H, Roscani GN, Jaques M, Villares MC et al. Extensive Cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 916-19.

Raviglione MC, Gupta R, Dye CM, Espinal MA. The burden of drug-resistant tuberculosis and mechanisms for its control. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 953: 88-97.

Smith DR. restriction Endonuclease Digestão of DNA. In: (Harwood A J, Ed.) *Methods in Molecular Biology*, Vol 58: Basic DNA and RNA protocols, pp 11-15. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 1996.

Soini H, Pan XI, Amin A, Graviss EA, Siddiqui A, Musser JM. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 : 669-676.

Suffys PN, Araujo MEI, Rossetti ML, Zaha A, Barroso EW, Barreto AMW et al. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strain of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an internacional fingerprinting database. Res. Microbiol. 2000; 151: 343-51.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid Identification of *Mycobacteria* to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzima analysis. J. Clin. Microbiol. 1993; 31 (2): 175-8.

Thierry D, Brisson-Noel A, Vicent-Lévy frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B.

Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 2668-73.

van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 406-9.

van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PWE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strain: Evaluation of a insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 2578-86.

van Soolingen D, Haas PEW, Hermans PW, Groenen PMA, van Embden JDA. Comparison of varius repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1993; 31 (8): 1987-95

van Soolingen D, Qian L, Haas PEW, Douglas JT, Traore H, Portales F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 3234-8.

van Soolingen D, Haas PEW, Kremer K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. National Institute of Public Health and Environmental, Bilthoven, the Netherlands, 1999.

World Health Organization. Global tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2004, Geneva: WHO/HTM/TB, 331, 2004a.

Young DB. Ten years of research progress and wath's to come. Tuberculosis. 2003; 83: 77-81.

8 – ANEXO 1: PUBLICAÇÃO

Elsevier Editorial System(tm) for Tuberculosis

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: IS6110 POLYMORPHISM IN Mycobacterium tuberculosis ISOLATES
FROM HIV INFECTED

PATIENTS LIVING IN MAPUTO, MOZAMBIQUE

Article Type: Letter to the Editor / Correspondence

Section/Category:

Keywords: Mycobacterium tuberculosis; IS6110 RFLP; Tuberculosis

Corresponding Author: Dr Marcelo de Carvalho Ramos, MD

Corresponding Author's Institution: Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP)

First Author: Audrey J Basso, BSC

Order of Authors: Audrey J Basso, BsC; Alessandra C Panunto, BsC; Elizabete
A Nunes, MD; Maria Cecília B Villares, BsC; Phillip N Suffys, MD; Eduardo M Capitani,
MD; Marcelo de Carvalho Ramos, MD

Manuscript Region of Origin:

Abstract: *IS6110* RFLP has been the most widely used genetic subtyping method for *M. tuberculosis* strains, to characterize disease outbreaks or for evolutionary genetics studies. In Mozambique, where tuberculosis exhibits a high prevalence, there is not enough information about *IS6110*-RFLP patterns of local *M. tuberculosis* strains. The description of the fingerprinting patterns obtained with this methodology can be useful locally for epidemiological purposes, and internationally to investigate the relatedness of strains isolated in Mozambique to other areas of the world. In this study, a collection of 158

isolates of *M. tuberculosis* strains, as identified by using *hsp65*-PRA, recovered from HIV-infected patients with pulmonary tuberculosis residing in Maputo, Mozambique, was genotyped. The number of *IS6110* copies ranged from 1 to 18, with 21.5% of strains exhibiting less than six copies. A total of 10 clusters were found, one consisting of three strains and all the others of two strains. Isolates showing less than six bands were not included in the cluster analyses due to low discriminatory power of the analysis. Based on similarity coefficients 85% of strains had more than 65% homology. This data show that *M. tuberculosis* strains obtained in Mozambique, Africa can be analyzed for epidemiological purposes with the use of this genotyping technique. However, a considerable number of strains exhibited a low number of *IS6110* copies, and a second genetic marker as spoligotyping has to be used. Most strains showed relatedness higher than 65% as revealed by the similarity coefficient.

**IS6110 POLYMORPHISM IN *Mycobacterium tuberculosis* ISOLATES FROM
HIV INFECTED PATIENTS LIVING IN MAPUTO, MOZAMBIQUE**

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) remains one of the most important infectious causes of death in the world, both in industrialized and developing countries¹. The incidence and morbidity from TB have been greatly exacerbated by the Human Immunodeficiency Virus (HIV) pandemic². Therefore, strategies for the control and elimination of TB among foreign-born persons at high risk should be directed toward the treatment of latent TB infection. The restriction fragment-length polymorphism analysis probing the insertion sequence IS6110, has been a valuable tool to study TB transmission chains³. This method allows for inferences, based on the similarity of strain fingerprints. The standardization of the method also allows for comparison of the DNA profiles of fingerprints created in different laboratories and tracking possible transfer of isolates between geographic areas⁴. In countries with inadequate TB control, non-standardized treatment is common, resulting in multiple re-treatment regimens and high rates of MDR-TB. In many countries from Sub-Saharan Africa, where control programs are well established, the numbers of new TB cases are steadily increasing due to the presence of HIV⁵. Mozambique has a population of almost twenty million people; and the prevalence of tuberculosis is 265 per 100000 inhabitants. 48% of TB patients are co-infected with HIV⁶. Only one genotyping study has ever been previously done in Mozambique, with a small number of strains⁷. The description of the fingerprinting patterns obtained with this methodology can be useful locally for epidemiological purposes, and internationally to investigate the relatedness of strains isolated in Mozambique to strains isolated in other areas of the world.

PATIENTS AND METHODS

Setting - The study was carried out in two large general hospitals located in Maputo: The Hospital Central de Maputo (HCM), and Hospital Geral de Machava. The first is the reference for the south region of the country, and the second is the national reference for TB cases. Most of TB/HIV co-infected patients are admitted to those facilities when hospitalization is needed. The study was conducted from October 2002 through August 2004.

Study population - Patients admitted with suspicion of pulmonary tuberculosis, and unknown HIV statuses were evaluated. The diagnosis of tuberculosis was done on the basis of complaints, clinical findings, chest X-ray findings, AFB smear, and culture.

AFB smear, and culture - Sputum samples and bronchial lavage effluents (BLE) were processed by Ziehl-Neelsen, Fuchsin or Auramine stain. Löwenstein-Jensen and Stonebrink culture media were used simultaneously for cultures in all cases **Identification of Mycobacteria** - Polymerase Restriction Analysis (PRA) of *hsp65* gene was used for species level identification of isolates, as recommended⁸. *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains were further identified with amplification and restriction of *gyrB* gene products as reported⁹. These tests were done at the Bacterial Pathogenesis Laboratory, UNICAMP, Brazil.

IS6110 RFLP - This method was performed by an international standardized protocol⁴. Fingerprint patterns were analyzed using Gel-Compar Bio Numerics® 4.50.

RESULTS AND DISCUSSION

The advanced understanding of the molecular biology of *M. tuberculosis* has proven invaluable in unraveling the epidemiology of TB₃. In Mozambique, molecular typing and population-based data for epidemiology and transmission studies of TB are scarce.

During the study period, 506 patients were evaluated, 335 had positive cultures, and 315 were subsequently identified as *M. tuberculosis*. From this subset of strains IS6110 genotyping was performed in 158 isolates, each one corresponding to one patient. These numbers can be seen in Figure 1. Overall, 113 distinct RFLP patterns were found. Individual fingerprints had from 1 to 18 IS6110 copies. Most strains exhibited twelve IS6110 copies. This data is shown in Graphic 1. 10 clusters were characterized: one consisting of three isolates and the remaining of two isolates each. Isolates showing less than six bands (n=34; 21.5%) were not included in the cluster analyses due to the low discriminatory power of the analysis. Based on similarity coefficients, 85% of strains had more than 65% homology. This data shows that *M. tuberculosis* strains obtained in Mozambique, Africa can be analyzed for epidemiological purposes with the use of this genotyping technique. However, a considerable number of strains exhibited a low number of IS6110 copies, and a second genetic marker as spoligotyping has to be used to group these strains for clustering analysis. Most strains showed relatedness higher than 65% as revealed by the similarity coefficient.

REFERENCES

1. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin. Chem 2001; 47: 809-814.
2. Hopewell PC. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. Semin. Respir Infect. 1989; 4: 111-122.
3. van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J. Intern. Med.2001; 249: 1-26.
4. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, McAdam R, Shinnick TM, Small PM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 406-409.
5. Mac A A, Gloyd S, Perdigão P, Noya A, Scarlal J, Kreiss J. Characteristics of drug resistance and HIV among tuberculosis patients in Mozambique. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2001;5 (10):894-902.
6. Nunes EA, Capitani EM, Coelho E, Joaquim OA, Figueiredo RO, Cossa AM, et al. Patterns of anti-tuberculosis drug resistance among HIV-infected patients in Maputo, Mozambique, 2002-2003. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2005; 9 (5): 494-500.

7. Caugant DA, Sandven P, Eng J, Jeque J T, Tonjum T. Detection of rifampin resistance among isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mozambique. *Microb. Drug. Resist.* 1995; winter 1 (4) 321-6.

8. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid Identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chainreaction and restriction enzima analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31 (2): 175-8.

9. Niemann S, Harmsen D, Rüsç-Gerdes S, and Richter E. Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by *gyrB* DNA Sequence Polymorphism Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (9): 3231-3234.

Figure 1

