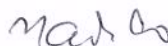


ANA LÚCIA ROSCANI CALUSNI

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO DE CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis ISOLADAS DE PACIENTES
PORTADORES DE TUBERCULOSE PULMONAR
ATENDIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNICAMP**

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de Ciências Básicas, da Bióloga ANA LÚCIA ROSCANI CALUSNI.



*Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos
Orientador*

CAMPINAS

2003

i

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

ANA LÚCIA ROSCANI CALUSNI

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO DE CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis ISOLADAS DE PACIENTES
PORTADORES DE TUBERCULOSE PULMONAR
ATENDIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNICAMP**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Clínica Médica, área de Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO DE CARVALHO RAMOS

CAMPINAS

2003

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof. Dr. MARCELO DE CARVALHO RAMOS

Membros:

1. Prof. Dr. Domingos Alves Meira

2. Prof. Dr. Afrânio Lineu Kritski

3. Prof. Dr. Luiz Jacinto da Silva

4. Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

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

Data: 30/06/2003

200333704

DEDICATÓRIA

A Eduardo e a minha filha, Laís:

*Nas horas de desânimo, quando os obstáculos pareciam atingir o infinito,
sempre derramaram apoio, incentivo, alegria e compreensão.*

Sempre presentes, fazendo-me companhia.

Que um dia eu possa retribuir tanto amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A DEUS:

*Do nada para o vazio,
vai o homem que nada produz.
Através da família, verdadeiro braço de Deus,
Ele nos anima, orienta e conduz.
Não teria conseguido, não teria suportado,
mas hoje aqui estou, objetivo atingido, sonho realizado.*

A MEUS PAIS:

Às vezes não entendemos, às vezes não somos entendidos.

Mas nunca faltou disposição. É neles que sempre penso.

Tenho um sentimento de gratidão imenso.

Tenho sua presença na alma e no coração.

A MINHA IRMÃ GLAUCIA:

Companhia para a vida toda, sempre disposta a ajudar, quando as tarefas se acumulavam e a rotina cansava, ela dizia: “Deixa que eu faça, eu te ajudo”. Sua presença, em muitas tardes no laboratório, além de auxílio prático, muito me motivou e alegrou o espírito.

Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos:

*Agradeço a confiança e a oportunidade de trabalhar neste projeto,
que será, sem dúvida, a peça mais importante na minha vida profissional.*

*Norte e Sul, orientação e rumo,
sempre os recebi de forma calma e tranquilizadora.*

Sua experiência e capacidade muito me ajudaram.

Clarisa Ramos, pela ajuda valiosa na padronização das técnicas, pelo empréstimo de equipamentos que tornou possível dar início a este projeto.

À Prof^a Dr^a Angélica Zaninelle Schreiber, docente responsável pelo Serviço de Microbiologia Clínica do HC/ Unicamp, por todo incentivo e compreensão que demonstrou durante esta dura jornada que está terminando.

À Prof^a Dr^a Maria Cecília B. Villares, docente do Laboratório de Microbiologia do DPC/FCM Unicamp, pelo incansável companheirismo e estímulo nas padronizações das técnicas

Às amigas Ângela e Shirley pelo apoio.

Às funcionárias do setor de meios de cultura do Laboratório de Microbiologia. Dalva, Jandira e Belmira, pela indispensável ajuda na preparação dos meios de cultura e materiais utilizados.

Aos funcionários do setor de Micobactérias do Laboratório de Microbiologia, Marcel e Wagner, pela colaboração, paciência e a companhia na hora do trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de AIDS, Silvia, Marcina, Vera, Moacir por dividirem comigo o espaço de trabalho que é da rotina e pelos poucos minutos de descanso que tínhamos para tomar um café.

À amiga Eliane Picolli Alves, pelo incentivo nas horas difíceis.

Dra. Lucilaine Ferrazolli, do Instituto Adolfo Lutz – SP, pelas importantes informações técnicas, fornecimento de cepa e sugestões.

Aos amigos do Laboratório de Patogênese Bacteriana e Biologia Molecular, pelas horas agradáveis que passamos juntos.

A Mariângela e Verônica do Núcleo de Vigilância Epidemiológica do Hospital das Clínicas pelas valiosas informações.

Aos pacientes.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram com este trabalho.

Muito obrigada.

	<i>PÁG.</i>
RESUMO.....	<i>xvii</i>
ABSTRACT.....	<i>xix</i>
1- INTRODUÇÃO.....	21
1.1- Aspectos microbiológicos e considerações gerais a respeito da epidemiologia da tuberculose.....	22
1.2- Métodos de biologia molecular aplicados à epidemiologia da tuberculose.....	25
2- OBJETIVOS.....	32
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	34
3.1- Casuística.....	35
3.2- Métodos.....	35
3.2.1- Pesquisa direta, isolamento e identificação das micobactérias isoladas nas amostras clínicas enviadas ao laboratório.....	35
3.2.1.1- Pesquisa direta.....	35
3.2.1.2- Descontaminação.....	36
3.2.1.3- Isolamento - Cultivo em BACTEC-460TB.....	37
3.2.1.4- Identificação.....	39
3.2.1.4.1- Sensibilidade ao p-nitro- α -acetil-amino- β - hidroxipropiofenona (NAP).....	39
3.2.1.4.2- Identificação através de sondas de DNA (Gen Probe-ACCUPROBE, San Diego, California, USA).....	39

3.2.2- Síntese da sonda IS6110.....	40
3.2.3- Demonstração do perfil genotípico através da restrição com <i>PvuII</i> e hibridização com o elemento de inserção IS6110 (“Southern blotting”).....	41
3.2.3.1- Extração do DNA genômico.....	41
3.2.3.2- Digestão do DNA cromossômico por enzima de restrição(<i>PvuII</i>).....	43
3.2.3.3- Gel para o “Southern blotting”.....	44
3.2.3.4- Transferência do DNA (“blotting”).....	45
3.2.3.5- Marcação da sonda, hibridização e revelação.....	45
3.2.4- Análise dos perfis genotípicos.....	45
4- RESULTADOS.....	47
5- DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	70
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
8- ANEXOS.....	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

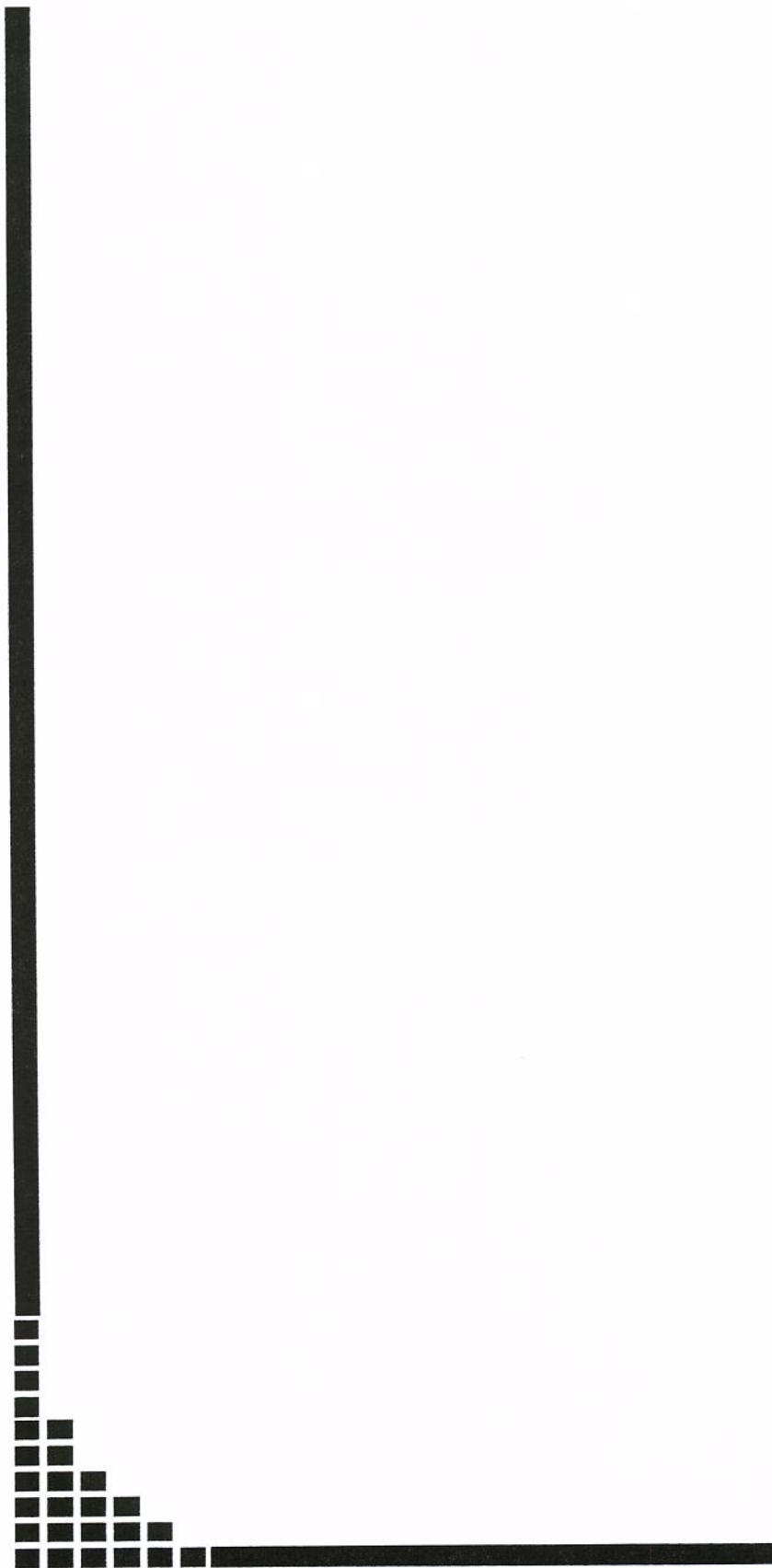
ng	nanograma
μl	microlitro
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
CTAB	Brometo de trimetil hexadecil amônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DPC	Divisão de Patologia Clínica
DR	“Direct Repeat”
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GI	“Grow Index” Índice de crescimento
GTG	“Repeat of the triplet GTG”
H ₂ O	Água
HCL	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
h	horas
IS	“Insertion Sequence” (Seqüência de Inserção)
M	molar
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

ml	mililitro
MOTT	Micobactéria não <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MPTR	“Major Polymorphic Tandem Repeat”
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NAP	p-nitro- α -acetil-amino- β -hidroxipropiofenona
°C	graus centígrados
pb	“base pair” (pares de base)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)
PGRS	“Polymorphic GC Rich Tandem Repeat”
RFLP	“Restriction fragment length polymorphism” (polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição)
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotação por minuto
SDS	Sódio duodecil sulfato
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	unidades
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
URL	Unidade Relativas de Luz
V	Volt

	PÁG.
Tabela 1- Distribuição de indivíduos estudados, segundo o sexo e a idade.....	48
Tabela 2- Distribuição de indivíduos estudados, segundo o ano de diagnóstico e padrão de RFLP.....	49
Tabela 3- Distribuição de indivíduos estudados, segundo o ano de diagnóstico da tuberculose e infecção ou não pelo HIV.....	50
Tabela 4- Distribuição de indivíduos estudados,segundo o estado de infecção pelo HIV e relacionados a conglomerados.....	55

	PÁG.
Figura 1- Mapa físico do elemento de inserção <i>IS6110</i>	28
Figura 2- Coloração de Ziehl- Neelsen positivo para BAAR.....	36
Figura 3- Frasco 12B para cultura de micobactérias.....	38
Figura 4- Crescimento de <i>M.tuberculosis</i> em meio sólido de L-J.....	38
Figura 5- Sonda obtida do fragmento <i>IS6110</i>	41
Figura 6- DNA de alto peso molecular.....	42
Figura 7- Digestão do DNA com a enzima <i>PvuII</i>	43
Figura 8- Gel após 18h de corrida.....	44
Figura 9- Filme de RX para análise do padrão de bandas.....	46
Figura 10- Distribuição de cepas agrupadas, segundo a data de seu isolamento e o conglomerado (“cluster”).....	54
Figura 11- Padrão “BE”.....	56
Figura 12- Padrão “BF”.....	57
Figura 13- Padrão “BH”.....	58
Figura 14- Padrão “AZ”.....	59
Figura 15- Padrão Houston “137”.....	60
Figura 16- Padrão “Z”.....	61
Figura 17- Padrão “AK”.....	62

	<i>PÁG.</i>
Gráfico 1- Distribuição de indivíduos estudados, segundo o ano de diagnóstico da tuberculose e infecção ou não pelo HIV.....	51
Gráfico 2- Distribuição do número de cepas isoladas, segundo o número de seqüências da IS6110 no genoma e os agrupamentos.....	53



RESUMO

A tuberculose é um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo e a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) tem um papel importante no agravamento deste quadro. Estima-se que existam de 35 a 45 milhões de pessoas infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* no Brasil; este grande número de casos vem despertando o interesse em se investigar melhor a epidemiologia da doença. Esta investigação tem como ferramenta importante as técnicas de biologia molecular, que estão sendo cada vez mais utilizadas. A técnica melhor padronizada e mais utilizada é o RFLP com a IS6110, por meio da qual podemos demonstrar o número e as posições das seqüências de inserção IS6110 no cromossomo do *Mycobacterium tuberculosis*.

As amostras foram isoladas de pacientes portadores de tuberculose pulmonar, atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp, no período de janeiro de 1996 a março de 1999. Foram estudados 76 pacientes, a maioria do sexo masculino, com faixa etária entre 20 e 40 anos. O DNA cromossômico das cepas foi obtido através da técnica de extração internacionalmente padronizada.

Após análise dos padrões de bandas obtidos e comparação dos dados com um banco internacional, cinquenta e nove isolados revelaram perfil genotípico único, enquanto que outros dezessete foram agrupados em conglomerados distintos. Dez pacientes foram agrupados em conglomerados arbitrariamente designados como se segue: padrão "BE" com 2 pacientes, padrão "BF" com 6 pacientes, padrão "BH" com 2 pacientes e um padrão "AK", descrito em uma contaminação laboratorial, em um paciente. Nos seis pacientes restantes, foram encontrados padrões anteriormente descritos por um grupo de Houston (EUA), que são: padrão "137" encontrado em Houston com 3 pacientes; padrão "Z" encontrado em El Paso e Juarez com 1 paciente e padrão "AZ" encontrado em Nova York com 2 isolados. O fato de utilizar uma técnica padronizada por vários centros de pesquisa possibilita a comparação dos padrões obtidos e assim confirmar a transmissão global da tuberculose.



ABSTRACT

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Tuberculosis is a major concern in developing countries. The contribution of genotyping techniques to trace epidemiological chains is remarkable, IS 6110 RFLP being the preferred typing method. AIDS epidemics has had a major impact on the incidence of tuberculosis. Not so many genotyping studies have been made in Brazil in order to check for the number of IS6110 present in local strains of *M. tuberculosis*, as well as the distribution and clustering of *M. tuberculosis* strains.

We performed DNA fingerprinting using Restriction-Fragment-Length-Polymorphism (RFLP) analysis of at least one isolate from every patient with positive AFB smear, confirmed pulmonary tuberculosis at a major hospital in Campinas, São Paulo, Brazil from January 1996 through July 1999. All fingerprints were analyzed using proper software, and compared to an international database from the Institute for the Study of Human Bacterial Pathogenesis, Department of Pathology, Baylor College of Medicine. Medical records were reviewed for relevant clinical data. During the study period, 98 patients were included, yielding 76 fingerprints. All *M. tuberculosis* strains had an adequate number of IS6110 (5-21) for the analysis. HIV infection was confirmed in nearly half the patients when it was available. 58 strains exhibited unique patterns whereas 17 others could be grouped in 7 clusters (2 to 6 strains in each cluster). When compared to the mentioned database, 6 strains matched the same genotype from strains originated from El Paso, Juarez, Houston, and New York. Some clustered strains could be recovered during almost all the study period. *M. tuberculosis* strains recovered from patients in Brazil can be genotyped using IS6110 RFLP, since they harbor an adequate number of such sequences. Recently acquired infections could be documented in 19% of cases since the strains could be clustered. The transmission of infection is intense, since some of clustered strains could be recovered during all the study period. The global dissemination of *M. tuberculosis* strains could be evidenced by demonstration of identical fingerprints occurring in a distant country.



1- INTRODUÇÃO

1.1- ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E CONSIDERAÇÕES GERAIS A RESPEITO DA EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

A tuberculose continua sendo um importante problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 30% da população mundial, ou 1,7 bilhão de indivíduos estejam infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Nos países em desenvolvimento, ocorrem, aproximadamente, 2,8 milhões de mortes por tuberculose e 7,5 milhões de casos novos a cada ano, atingindo todos os grupos etários, com o predomínio de indivíduos economicamente ativos. Nos países desenvolvidos, cerca de 40.000 mortes são devidas à tuberculose e mais de 400.000 casos novos são descobertos a cada ano. Nesses países, a tuberculose é mais freqüente entre as pessoas idosas, nas minorias étnicas e nos imigrantes (HEIFITS, 1996; VERONESI & FOCACCIA, 1996; BRASIL, 1998).

No Brasil, estima-se que de 35 a 45 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* e que ocorram, aproximadamente, 100 mil casos novos de doença por ano. O número de mortes anuais por tuberculose, em nosso meio, é de 4 a 5 mil (BRASIL, 1998).

A síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), sem dúvida, tem papel no agravamento do quadro da tuberculose, principalmente nos países desenvolvidos. Contudo, naquelas regiões mais pobres, como no caso do Brasil, onde se estima existirem cerca de 600 mil de infectados pelo HIV, essa síndrome também deve agravar o quadro, fazendo surgir, influir desfavoravelmente sobre a evolução e, ainda, ocasionar o desenvolvimento de formas resistentes à terapêutica clássica dessa doença.

A coexistência das infecções pelo HIV e pelo *M. tuberculosis* é tão intensa e crescente que devemos passar de 4% de co-infectados em 1990 para 14% em 2000, ou seja, um em cada sete pacientes infectados pelo vírus da aids tem tuberculose (HEIFITS, 1996). Esse acréscimo deve ser fruto das más condições de atendimento e convívio desses pacientes com outros que possuem formas ativas de tuberculose, a forma contagiosa da doença. Isso se dá nas casas de apoio aos pacientes com aids, ambulatorios, hospitais e moradias próprias. Além da transmissão nos infectados pelo HIV ser mais intensa, os

portadores de microrganismos resistentes aos quimioterápicos de primeira linha são disseminados rapidamente, na forma de surtos, elevando a letalidade da doença, já que são bactérias mais difíceis de serem controladas.

No Brasil, no ano de 1995, foram notificados 90.978 novos casos de tuberculose (Coeficiente de Incidência - $CI_{tb} = 58,6/100$ mil habitantes), dos quais 45.650 foram formas pulmonares bacilíferas ($CI_{tb} = 29,4/100$ mil hab.). As desigualdades sócioeconômicas regionais, bem como as características individuais dos aglomerados urbanos, fazem essas taxas variarem, como por exemplo: de 126,8/100 mil hab. no Rio de Janeiro a 25,1/100 mil em Goiás (BRASIL, 1998).

Em toda parte, os casos de tuberculose são encontrados em aglomerados de indivíduos, não afetando a população de um modo uniforme. Algumas associações têm sido feitas com determinados grupos etários, indivíduos sem moradia, usuários de drogas, alcoólatras, presidiários e recém-nascidos (MURRAY *et al.* 1999), podendo também haver recaídas de infecções passadas naqueles pacientes portadores de agravos ao sistema imune, como: gastrectomizados, diabéticos, renais crônicos, infectados pelo HIV, entre outros. (VERONESI & FOCACCIA, 1996; BRASIL, 1998).

A transmissão da tuberculose, de um indivíduo doente para seus contactantes, já era conhecida pelos egípcios, que os segregavam. Em 1948, foi demonstrado que apenas as partículas menores, com bacilos em suspensão no ar, produto de ressecamento de grandes partículas, alcançavam os alvéolos e iniciavam a lesão primária. Outros estudos revelaram que partículas maiores tendem a se depositar no chão, misturando-se com a poeira, enquanto que as menores levitam no ar. Dessas, são contagiantes apenas as que se ressecam, alcançando um tamanho de 2 a 10μ e apresentam características aerodinâmicas semelhantes às dos gases (gotícula-núcleo de Wells). Tais partículas, às vezes com um a dois bacilos viáveis, conseguem chegar aos alvéolos, onde esses germes se implantam. A principal porta de entrada do bacilo é a via respiratória. A via digestiva assume papel de importância apenas na tuberculose causada pelo bacilo bovino (*Mycobacterium bovis*). Outras vias de aquisição são excepcionais. (VERONESI & FOCACCIA, 1996; MURRAY *et al.*, 1999).

O microrganismo responsável pela tuberculose humana, o *Mycobacterium tuberculosis* foi descoberto em 1882 por Robert Koch. Esse bacilo é hoje um dos integrantes do “complexo *M. tuberculosis*”, que inclui: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microtii*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium canettii* que são fenotípica e genotipicamente semelhantes.(VERONESI & FOCACCIA, 1996; van SOOLINGEN *et al.*, 1997).

O crescimento desses bacilos é lento. Sua população duplica a cada 18 a 48 horas, o que torna a tuberculose uma doença de evolução lenta e crônica na maioria dos casos. São também microrganismos bastante suscetíveis aos agentes físicos e químicos do ambiente, não conseguindo sobreviver fora de organismos vivos a não ser por algumas horas. (VERONESI & FOCACCIA, 1996; MURRAY *et al.*, 1999).

O laboratório de micobacteriologia tem papel importante no controle da tuberculose, fornecendo o resultado rápido da baciloscopia, isolando a micobactéria, identificando-a e fazendo os testes de susceptibilidade à antimicrobianos dos bacilos isolados. A rapidez na divulgação desses resultados deve ser observada, já que há uma situação de aumento do número de casos de tuberculose e, principalmente, de surtos, envolvendo organismos resistentes, inclusive, a mais de dois dos quimioterápicos usados como primeira opção de tratamento (BRASIL, 1998).

O avanço observado nas técnicas de cultivo e de biologia molecular, tem propiciado grandes mudanças na rotina desses laboratórios. Como exemplos, citam-se: o cultivo em meios seletivos, com a adição de produtos que detectam o crescimento não visível do microrganismo, como o BACTEC 460 TB (Beckton e Dickson - método radiométrico), outros métodos colorimétricos e a utilização de reações de amplificação para a detecção de partes do genoma específicas do *M. tuberculosis* (PCR), feitas diretamente no material clínico (escarro, líquidos, etc). Um outro exemplo é a identificação rápida da micobactéria em nível de espécie com a utilização de sondas dirigidas a seqüências específicas do seu DNA ou RNA (GenProbe-Accuprobe) (VERONESI & FOCACCIA, 1996). Essas técnicas, entretanto, ainda não substituíram o diagnóstico convencional da tuberculose, feito através da pesquisa direta de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) e a

cultura em meio de Löwenstein-Jensen. Os métodos modernos mencionados têm a vantagem de informar, rapidamente ao clínico o seu resultado.

Em estudo, realizado por ELLNER *et al.* (1998), a combinação do cultivo pelo BACTEC e as identificações utilizando-se sondas de DNA permitiram a caracterização de 89% de 176 isolados de *Mycobacterium tuberculosis* e 89% de 110 isolados de *Mycobacterium avium*. O que mais chamou a atenção dos autores foi a redução de 5 a 7 semanas no tempo necessário para a liberação do resultado final, em comparação com os métodos convencionais de isolamento e séries bioquímicas para identificação (KONEMAN *et al.*, 1997; ELLNER *et al.*, 1988).

1.2- MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADOS À EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

O avanço das técnicas genéticas e moleculares, com fins epidemiológicos, permitiu a caracterização de clones de diferentes microrganismos, entre eles o *Mycobacterium tuberculosis*. Diversas são as técnicas aplicadas a esses estudos, cada uma delas baseadas em métodos, desde os enzimáticos, aos que procuram estudar elementos variáveis do genoma, esse último em maior número. Cada espécie de microrganismo tem, baseada em suas características individuais, uma técnica que mais se adapta à caracterização de suas diversas cepas.

A lógica dos trabalhos que se utilizam do polimorfismo do genoma é a de que, continuamente, são incorporados, perdidos, ou trocados de posição, trechos, ou mesmo bases isoladas, o que torna uma célula bacteriana (=indivíduo) diferentes das demais. No caso de organismos assexuados e procariontes, como é o caso das bactérias, essa dinâmica é até mais intensa. O elemento a ser pesquisado, entretanto, deve ter uma certa estabilidade para que a relação entre parentes próximos não seja perdida. Por outro lado, esse elemento deve também propiciar a individualização à medida que o parentesco diminui. Não há outra maneira de identificar essa técnica, a não ser através de sua aplicação, portanto, experimentando.

No complexo *Mycobacterium tuberculosis*, em razão da proximidade genética das subespécies há um alto grau de polimorfismo de DNA associado à DNA repetitivo como: sequência 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 element” (THIERRY *et al.*, 1990; MARIANI *et al.*, 1993; FANG *et al.*, 1998; KREMER *et al.*, 1999). Em contraste com a IS6110 que pode possuir uma grande variedade no número de cópias no genoma, a IS1081 está presente em 5 ou 7 cópias, estando associada a um polimorfismo de DNA limitado (FANG *et al.*, 1998; 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).

Os principais tipos de seqüência curta repetitiva de DNA com grau de diversidade genética identificados para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* são: “Polimorphic GC Rich Tandem Sequence (PGRS)”, “Repeat of the Triplet GTG”, “Major Polymorphic Tandem Repeat (MPTR)”, que estão presentes em múltiplos “loci” cromossômicos e o estudo do sítio denominado “Direct Repeat” (DR) (GUTIÉRREZ *et al.*, 1998). Os elementos curtos de repetição, ou “Direct Repeats (DR)”, têm comprimento de 36 pares de base (bp), são encontrados em um único locus do cromossomo e são separados por seqüências distintas, porém conhecidas, com comprimento de 35 a 41 pb. (KAMERBEEK *et al.*, 1997; KREMER *et al.*, 1999) O número das seqüências presentes nesse sítio (DR) varia de 10 a 50. A caracterização genotípica com vistas à identificação de clones, explora o tipo, a quantidade e a ordenação dessas seqüências, o que pode ser verificado através de técnicas de hibridização (“spoligotyping”) (van SOOLINGEN *et al.*, 1993; de la SALMONIÈRE *et al.*, 1997; KAMERBEEK *et al.*, 1997; van SOOLINGEN 2001). Este polimorfismo é, provavelmente, dado pela recombinação homóloga entre os intervalos dos DRs próximos ou distantes e o rearranjo dado pela IS6110.

As técnicas “PGRS”, “DR” e “GTG” têm sido utilizadas com um caráter complementar na genotipagem de cepas, em que a diferenciação pela IS6110 é insuficiente, isso ocorre quando determinada cepa não possui cópia da IS6110 em seu genoma ou tem um número menor que cinco, como é o caso de cepas isoladas na Ásia. (van SOOLINGEN

et al., 1993; DAS *et al.*, 1993; GOYAL *et al.*, 1997; BAUER *et al.*, 1999; KREMER *et al.*, 1999; van SOOLINGEN *et al.*, 1999; van SOOLINGEN 2001). Dos métodos de tipagem por PCR, o que é melhor padronizado é o “Mixed Linker PCR” que tem como alvo a IS6110 (HAAS *et al.*, 1993; van SOOLINGEN & HERMANS, 1995; KREMER *et al.*, 1999) e que utiliza um iniciador “primer” específico para essa sequência e um segundo complementar. Esse método tem a vantagem de gerar um padrão semelhante de bandas ao observado pela análise da tipagem pela IS6110.

Em um trabalho realizado por KREMER *et al.*, 1999, que compara os métodos de genotipagem mais utilizados como o “RFLP” e “PCR” verificou-se que o RFLP, utilizando como sonda a IS6110 e o “Mixed Linker PCR” são técnicas que possuem elevada reprodutibilidade e alto nível de diferenciação entre as cepas (tipabilidade), exceto para aquelas com número pequeno de sequências IS6110, em que teremos que diferenciá-las com a espoligotipagem ou o “Polimorphic GC Rich Sequence” (van SOOLINGEN *et al.*, 1993; KREMER *et al.*, 1999).

Desde a descoberta do polimorfismo do DNA em *Mycobacterium tuberculosis*, a genotipagem das cepas tornou-se uma ferramenta importante na epidemiologia da tuberculose. Dentre os vários elementos genéticos citados anteriormente, sem dúvida, a pesquisa do elemento de inserção IS6110 tem sido o que mais contribuiu para a epidemiologia molecular da tuberculose. Esta sequência de inserção tem sido encontrada exclusivamente em isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. (GARCIA, FERRERA, HOFFNER, 1997). O RFLP com a IS6110 é o método de tipagem molecular melhor padronizado e mais utilizado (HERMANS *et al.*, 1990; THIERRY *et al.*, 1990; van SOOLINGEN *et al.*, 1991; van EMBDEN *et al.*, 1993; ALLAND *et al.*, 1994; van SOOLINGEN *et al.*, 1999).

Em virtude do número variável de cópias e locais de integração da IS6110 no cromossomo, cepas não relacionadas epidemiologicamente mostram uma grande variação no polimorfismo no fragmento de restrição. Este polimorfismo é dado pela habilidade da IS6110 transpor-se dentro do genoma sem uma sequência alvo específica. Em linhas gerais, a técnica que demonstra a posição dessas sequências no genoma do *M. tuberculosis* (IS6110-RFLP) consiste no crescimento das colônias, extração e purificação do DNA,

digestão por endonuclease de restrição, transferência para membrana de náilon e a hibridização com sonda marcada com material não radioativo (van EMBDEN *et al.*, 1993).

A IS6110 possui 1355pb e possui sítios de corte para diversas enzimas de restrição, mas a recomendada para uso é a *PvuII* pelo fato de clivar essa sequência em um único local (Figura 1). As cepas de *Mycobacterium tuberculosis* geralmente contêm de 8 a 20 cópias da IS6110. Se pesquisarmos ambos os fragmentos, obtidos após a clivagem, teremos um aglomerado de 16 a 40 bandas sobrepostas, por isso, arbitrariamente, convencionou-se a utilização do lado direito da região de quebra com a enzima para a sondagem (van EMBDEN *et al.*, 1993, GARCIA *et al.*, 1997).

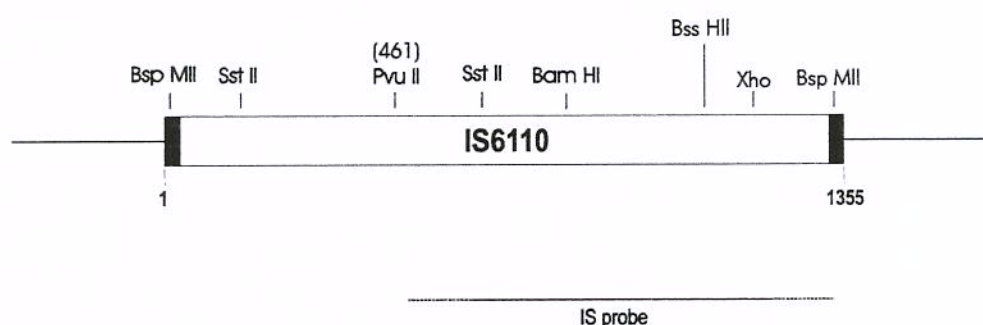


Fig.1 – Mapa físico do elemento de inserção IS6110 do *Mycobacterium tuberculosis* com 1355pb. Estão demonstradas posições de corte de outras enzimas de restrição. A enzima *Pvu II* corta o elemento de inserção no par de base 461. As linhas, à direita e à esquerda, representam DNA cromossômico.

Para o cálculo das posições das diversas bandas, é necessária a utilização de cepa de referência de *Mycobacterium tuberculosis* (MT14323) (van Embden 1993), que digerida pela *PvuII* e hibridizada, apresenta 12 bandas com tamanhos conhecidos. Essa cepa funciona, portanto, como marcadores externos da técnica.

A posição dessa sequência no genoma de determinada cepa é estável, como verificaram CAVE *et al.* (1991), utilizando seis isolados de *Mycobacterium tuberculosis*, provenientes de apenas um paciente e 42 isolados repetidos de *Mycobacterium tuberculosis*, provenientes de 18 pacientes. Nessas situações, o padrão permaneceu estável durante um período de 8 meses a 4 anos e meio e não se alterou por modificações nos perfis de resistência a drogas (van SOOLINGEN *et al.*, 1993).

A ancestralidade de cepas de *M. tuberculosis* também pode ser demonstrada por meio de pequenas mudanças do perfil genotípico de amostras isoladas, em intervalos grandes de tempo. Um interessante trabalho de van SOOLINGEN & HERMANS 1995, revela uma discreta alteração do perfil genotípico através do acréscimo de duas bandas e coincidência de doze outras, em dois exemplares de *M. tuberculosis* isolados de um paciente de setenta e três anos, quando de dois episódios de tuberculose, um na juventude e outro na velhice. Essa mudança ocorreu em, aproximadamente, cinquenta anos (van SOOLINGEN & HERMANS, 1995). Já é possível fazer uma análise com dados obtidos do estudo do polimorfismo de DNA, de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, isoladas da população de algumas regiões brasileiras. Em estudo realizado no Rio de Janeiro com análise do “fingerprinting” de DNA, de 53 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, isoladas de 38 pacientes com tuberculose, sem evidências de infecção por HIV e 19 cepas, isoladas de 15 pacientes com aids, noventa por cento das cepas possuíam de 6 a 15 cópias de IS6110 e apenas 4 cepas possuíam menos de 6 cópias. Do grupo analisado, 12 (22%) constituíam um clone. A comparação com os dados epidemiológicos de países, onde a prevalência de tuberculose é baixa, mostrou que a clonalidade das cepas é baixa entre os pacientes não infectados pelo HIV, mas extremamente alta entre os infectados. Uma das possíveis razões para o baixo número de clones de amostras entre os não infectados pelo HIV é que o diagnóstico foi realizado em serviços ambulatoriais, em diferentes regiões do Rio de Janeiro, e o número de casos estudados foi reduzido. Os pacientes com aids, ao contrário, são tratados em hospitais de referência (BURGER *et al.*, 1998). Um outro estudo realizado no Rio de Janeiro, analisou 120 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, armazenadas no período de um ano, através do RFLP, utilizando-se a IS6110. Noventa e sete dessas cepas possuíam um único padrão de bandas; cepas isoladas de outros 23 pacientes foram agrupadas em onze clones diferentes, distribuídos da seguinte maneira: um grupo com 3

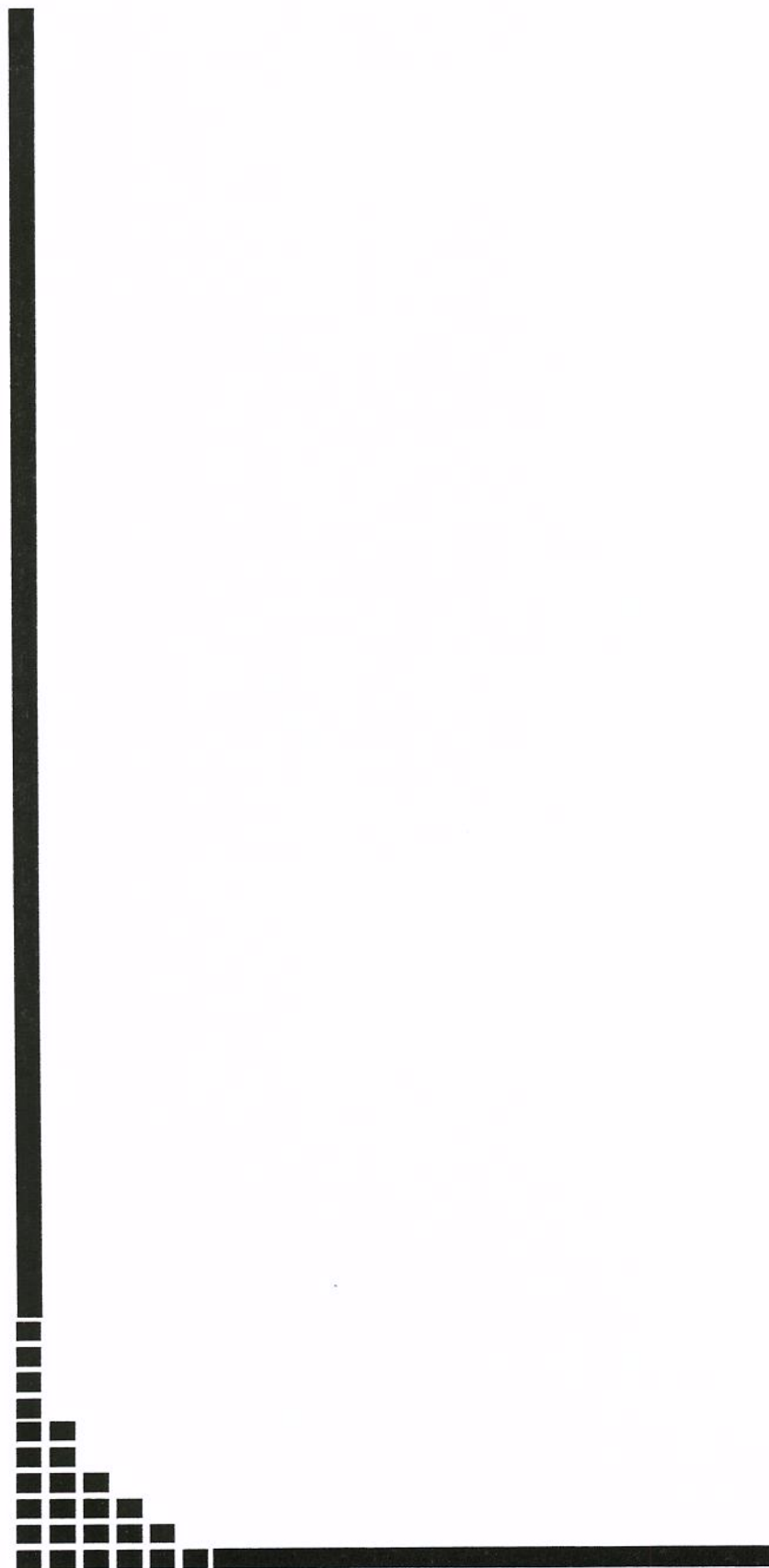
pacientes e 10 grupos com 2 pacientes cada. Quando analisadas, segundo algumas variáveis individuais, esses clones não possuíam associação com idade do paciente, infecção por HIV, tipo de residência, andarilhos ou tuberculose no passado, entretanto há uma associação consistente com a resistência aos quimioterápicos. Esses dados sugerem que a transmissão da tuberculose pode ser importante para o desenvolvimento de novos casos de doença, provocada por bactérias multirresistentes em pacientes atendidos em hospitais terciários do Rio de Janeiro (FANDINHO *et al.*, 2000).

Outro estudo realizado no Brasil, utilizando técnica de “Mixed Linker PCR, em uma população de 77 pacientes (onze infectados pelo HIV) do Estado do Paraná, foram genotipadas 78 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Das cepas analisadas, apenas 10 foram agrupadas em 5 pequenos clones, sugerindo a predominância de reativação da doença. Sete cepas possuíam apenas uma banda de diferença com outros isolados, sugerindo uma transmissão endêmica de cepas específicas ao longo do tempo (BRADEN *et al.*, 1997, BURGER *et al.*, 1998).

O número de cópias da *IS6110* em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* pode variar conforme a área geográfica do estudo (DAS *et al.* 1993; van SOOLINGEN *et al.* 1993; YUEN *et al.* 1993; SAHADEVAN *et al.* 1995; DIAZ *et al.* 1998). YANG *et al.* (1998) a fim de investigar a diversidade do “fingerprinting” de DNA utilizando a *IS6110* de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* nos EUA e, ainda, determinar se há transmissão interestadual da tuberculose, estudaram os genótipos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de 1326 pacientes de três Estados americanos (USA) geograficamente distantes. Foram encontrados 795 padrões de “fingerprinting” da *IS6110*. Quase todos os padrões encontrados foram observados em apenas um Estado, mostrando assim que a maioria dos padrões de “fingerprinting” da *IS6110* estão presentes em uma única localização geográfica. Para os padrões que foram isolados em mais de um Estado e que possuíam entre uma e cinco cópias da *IS6110* foi utilizada a tipagem através do pTBN12 (YANG *et al.*, 1996, YANG *et al.*, 1998). Uma única cepa foi encontrada em 57 pacientes dos três Estados. As investigações epidemiológicas realizadas não revelaram contato recente destes pacientes com tuberculose nestas cidades, não indicando, necessariamente, uma transmissão recente da doença, mas sim uma disseminação interestadual da doença, ocorrida alguns anos antes.

A fim de se conhecer os fatores de risco da transmissão da tuberculose na Holanda, foram analisados os padrões do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição de 78% dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis*, obtidos no período de 1993 – 1997. Dos 4266 casos estudados, 46% constituíam clones isolados com padrão de RFLP igual. A composição da maioria dos clones deste estudo é de menos do que 5 cepas e uma minoria (19%) era de grandes clones compostos de 15 ou mais casos. Os autores confirmam a observação de estudos anteriores que afirmam que pacientes pertencentes a grandes aglomerados de casos possuem algumas características como: indivíduos sem casa e usuários de drogas (van SCOLINGEN *et al.*, 1999).

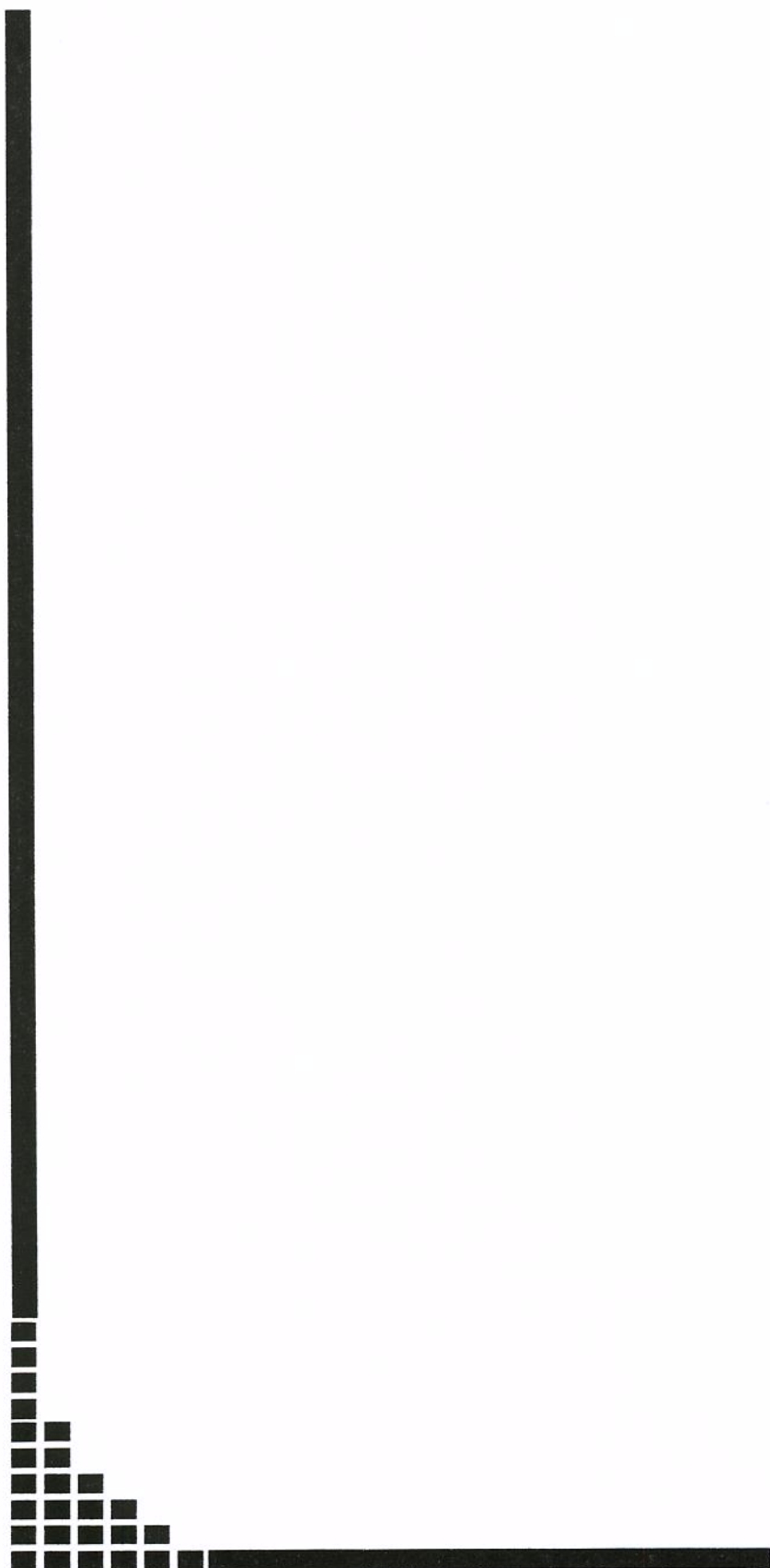
Como no Brasil temos ainda poucos trabalhos que analisaram o perfil genotípico do *Mycobacterium tuberculosis* e sendo o assunto de grande importância para o estudo epidemiológico da tuberculose, este estudo se propõe a analisar o perfil genotípico de cepas isoladas na região de Campinas.



2- OBJETIVOS

- a) Caracterizar o genótipo, através da demonstração do número e localização da sequência variável IS6110, de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes portadores de tuberculose pulmonar bacilífera, atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp.

- b) Comparar esses padrões genotípicos com um banco de genótipos do *Mycobacterium tuberculosis* existente em Houston, Texas, USA.



3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- CASUÍSTICA

Local do Estudo – O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Universidade estadual de Campinas. Hospital universitário com 404 leitos, referência terciária para Campinas e região.

Os pacientes com tuberculose são atendidos em diversas unidades da instituição como Moléstias Infecciosas, Pneumologia e Emergência. Foi obtido um consentimento da Comissão de Ética em Pesquisa da Instituição para a realização do trabalho, já que o material utilizado foi obtido de pacientes (Anexo 4).

Materiais clínicos – Foram estudadas todas as amostras de escarro, lavado brônquico e lavado brônquico-alveolar encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Clínica da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Unicamp, no período de 1996 a 2000, obtidas de pacientes com suspeita clínica de tuberculose pulmonar.

Essas amostras de escarro forneceram 77 cepas de *M. tuberculosis* que foram todas analisadas (Anexo 2). Esses isolados estudados corresponderam a casos em que a bacterioscopia foi positiva pelo método de coloração de Ziehl-Neelsen. Essas cepas cresceram, inicialmente, em meio de cultivo 12B do equipamento BACTEC 460TB e foram, a seguir, semeadas em meio inclinado de Löwenstein -Jensen e incubadas a 36°C até obtenção de crescimento uniforme, aproximadamente de vinte dias.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- Pesquisa direta, isolamento e identificação de micobactérias nas amostras clínicas enviadas ao laboratório.

3.2.1.1- Pesquisa direta

As amostras recebidas no laboratório foram processadas em capela de segurança biológica nível II no Setor de Micobactérias do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica, localizado no Hospital das Clínicas da Unicamp. O processamento inicial do material clínico é a preparação de esfregaço para a pesquisa de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Isso é feito a partir do escarro coletado pelo próprio paciente, ou por indução com salina hipertônica. Homogeneiza-se bem o material para que

se possa transferir para a lâmina uma porção significativa que represente secreção pulmonar, utilizando-se uma espátula de madeira descartável ou alça de platina. Espalha-se o material sobre a lâmina de vidro em uma área de, aproximadamente, 1,5 X 1,5cm. Deixa-se o esfregaço secar ao ar dentro da cabine de segurança. A seguir ele é fixado utilizando-se a chama do bico de Bunsen e prossegue-se com a coloração. A técnica seguida foi a de Ziehl-Neelsen, em que se cobre todo o esfregaço com fucsina fenicada, aquecida sobre a chama até a emissão de vapores, sem contudo deixar o corante secar, ou que entre em ebulição. Despreza-se então a fucsina e o esfregaço é descorado com a adição contínua de solução de álcool-ácido até que não apareça mais corante na lavagem. Adiciona-se azul de metileno para a coloração de contraste. O excesso de corante é retirado com água e o esfregaço é seco ao ar ambiente. A observação é feita ao microscópio, utilizando-se objetiva de imersão. (Fig. 2)



Fig. 2 – Coloração de Ziehl- Neelsen positiva para BAAR

3.2.1.2- Descontaminação

Nas amostras clínicas potencialmente contaminadas, em que será realizada a cultura para micobactéria, é necessária a sua descontaminação para obtermos uma cultura pura. O método utilizado foi o de Petroff Modificado, que consiste em transferir o material do paciente (não mais que 10 ml) para um tubo de fundo cônico com capacidade para 50ml e adicionar um volume igual de solução de NaOH 4%, homogeneizando o material em

agitador elétrico, manter em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. Com este procedimento, haverá a morte das bactérias contaminantes (inespecíficas) presentes na amostra. Completar o volume até a marca de 50 ml com tampão fosfato (0,067M pH6,8), fechar o tubo, homogeneizar por inversão, centrifugar e descartar o sobrenadante em solução desinfetante para posterior autoclavação, inocular 10ml do sedimento em frascos contendo meio 12B.

3.2.1.3- Isolamento - Cultivo em BACTEC-460TB

A amostra biológica tratada foi inoculada no meio BACTEC 12B, que contém um substrato (ácido palmítico) marcado com ^{14}C . A micobactéria presente na amostra utiliza o substrato e libera como produto de seu metabolismo o $^{14}\text{CO}_2$. Quando o frasco é testado no BACTEC 460TB (B-D, USA), esse gás produzido ($^{14}\text{CO}_2$) é aspirado e sua radiatividade é determinada quantitativamente e apresentada numericamente expressa numa escala que vai de 0 a 999. Esse valor numérico é designado como GI (Growth index – Índice de Crescimento). Após a leitura, o GI é mostrado pelo equipamento e o seu aumento diário é diretamente proporcional ao crescimento bacteriano porventura ocorrido. A cada leitura automática, feita pelo equipamento, é injetado CO_2 a fim de proporcionar uma atmosfera contendo 5 a 10% desse gás no frasco, o que agiliza o crescimento de micobactérias. Obtendo-se uma cultura positiva, o próximo passo será a identificação. (Fig.3).

A manutenção das culturas foi realizada com a semeadura da micobactéria, já isolada em meio de Löwenstein-Jensen, permanecendo em cultivo por aproximadamente 20 dias em estufa e depois congelada a -20°C até a sua utilização. (Fig. 4).

3.2.1.4- Identificação

3.2.1.4.1- Sensibilidade ao p-nitro- α -acetil-amino- β -hidroxipropiofenona (NAP).

O NAP (Beckton & Dickson, USA) é um composto intermediário na síntese do cloranfenicol, que inibe o crescimento de micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, mas não o de outros complexos. O teste com NAP foi realizado a partir de um crescimento em frasco 12B com GI entre 50 e 100. Verificou-se a ausência de contaminação. Transferiu-se um volume adequado do frasco 12B para um frasco de NAP, estabeleceu-se uma tensão de CO₂ e incubaram-se os frascos. O frasco de onde foi retirada a amostra serviu como frasco-controle. As leituras foram realizadas de 2 a 6 dias e seus índices de crescimento comparados. Obtendo-se duas leituras consecutivas com queda no GI, após a inoculação, considerava-se como microrganismo sensível ao NAP, ou seja, do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Complexo MTB). Aumentos diários de GI, ultrapassando 400 dentro de 4 dias, significava resistência ao NAP, portanto micobactéria outra que não tuberculosis (MOTT).

3.2.4.1.2- Identificação através de sondas de DNA (Gen Probe-ACCUPROBE, San Diego, California, USA).

As amostras selecionadas para este trabalho foram descongeladas e ressemeadas em Löwenstein-Jensen, para a confirmação da identificação através de sondas de DNA. Após crescimento de 15 a 20 dias das cepas de micobactérias, transferiu-se uma quantidade de células bacterianas, retiradas através de alça de inoculação, para o tubo de extração contendo reagente de diluição da amostra e reagente de diluição da sonda e submeteu-se a um banho sob ultra-som à temperatura ambiente. Os tubos foram incubados em banho-maria a 95°C, durante 15 minutos, para que houvesse a morte da micobactéria. Após esfriar, parte do sobrenadante foi transferido para o tubo contendo a sonda, incubou-se a 60°C por 15 minutos e foi adicionado o reagente de seleção, incubando os tubos em banho-maria a 60°C por 5 minutos. A leitura dos resultados foi realizada em luminômetro

que fornece uma medida baseada na quantidade de luz emitida por reação enzimática (unidades relativas de luz - URL). Emissões luminosas superiores a 30 000 URL significam que a sonda foi hibridizada, portando trata-se da micobactéria pesquisada. Os testes com leitura intermediária (entre 20 000 e 29 999 URL) foram repetidos. Para cada lote foram utilizados controles. O controle negativo é uma cepa de *M. avium* e o controle positivo *M. tuberculosis* H37rv.

3.2.2- Síntese da sonda IS6110

A sonda foi preparada através de reação de amplificação do DNA de *Mycobacterium bovis* BCG, que possui apenas uma cópia da IS6110. São utilizados os seguintes iniciadores (“primers”):

INS-1 (5’CGTGAGGGCATCGAGGTGGC)

INS-2 (5’GCGTAGGCGTCGGTGACAAA)

Para a reação utilizaram-se os seguintes reagentes: “primer” INS-1 50ng/μl, “primer” INS-2 50ng/μl, dNTP mix 2,5mM para cada dNTP, 30mM de MgCl₂, Taq polimerase 5 U/μl, 10x PCR buffer, 100ng do DNA alvo e água pura para adequar o volume final da reação . Essa mistura foi desnaturada, inicialmente, a 96 ° C por 3 min e, a seguir, submetida a 30 ciclos (96 ° C por 1 min., 65 ° C por 2 min. e 72 ° C por 2 min.), em seguida, uma extensão final por 6 min. a 72 ° C). O fragmento amplificado foi então purificado em gel de agarose de baixa temperatura de liquefação e coluna de fibras de vidro (QIAquick, QIAGEN, Alemanha). A concentração do fragmento de amplificação foi ajustada para 10 ng/μl para a marcação não radioativa. (Fig.5)

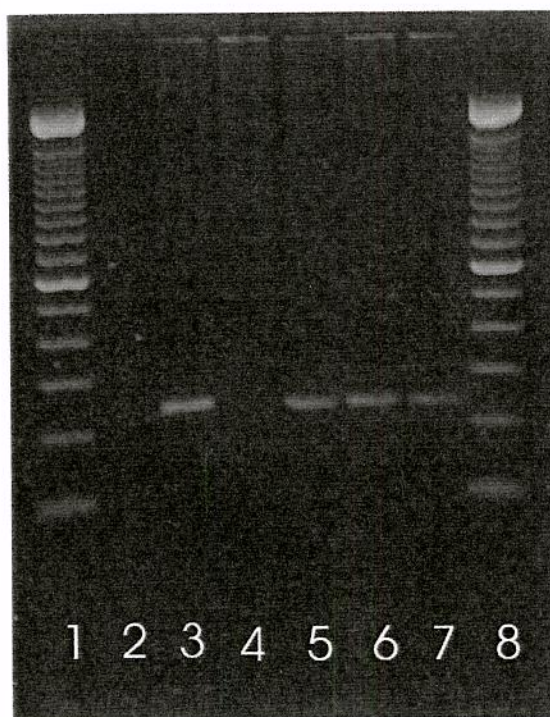


Fig.5 – Sonda obtida do fragmento IS6110 de uma cepa de *M.bovis* BCG. Linhas 1 e 8 marcador de tamanho (100pb), 2 e 4 branco; 3, 5, 6 e 7 sonda com 245pb.

3.2.3- Demonstração do perfil genotípico através da restrição com *PvuII* e hibridização com o elemento de inserção IS6110 (“Southern blotting”).

O método é o descrito por van Soolingen et al., modificado.(van Soolingen 1996a, van Soolingen 1999b)

3.2.3.1- Extração do DNA genômico

Após o crescimento recente (cerca de 30 dias) do *Mycobacterium tuberculosis* em meio de Löwenstein-Jensen, com auxílio de uma alça estéril, transferiu-se parte da cultura para tubos de microcentrífuga contendo 600µl de H₂O, foi aquecido por 20min a 80°C (morte da bactéria) e deixou-se a temperatura do material chegar a temperatura ambiente. Centrifugou-se por 15 minutos a 12000 rpm, descartando o sobrenadante e

ressuspensando o precipitado em 400 µl TE pH=8,0. A extração foi realizada com a adição de 50 µl de lisozima (40mg/ml) e incubado por uma noite a 37°C sob agitação, a seguir, adicionou-se 80 µl de solução de SDS (Duodecil Sulfato de Sódio) 10% adicionada de proteinase K (10mg/ml), homogeneizando rapidamente, e incubou-se por 10min a 65°C sob agitação, acrescentou-se 100 µl de NaCl 5M e 100 µl de CTAB (Brometo de Trimetil Hexadecil Amônio) /NaCl, pré-aquecidos a 65°C. A solução foi homogeneizada por inversão até tornar-se branco-leitosa e incubou-se por 10min a 65°C sob agitação. No final da extração, foi realizada a purificação do DNA com solução de clorofórmio/álcool isoamílico, precipitação com isopropanol a -20 °C e finalmente com solução de etanol a 70%. O material foi centrifugado e o sobrenadante descartado. Deixou-se o sedimento formado secar em temperatura ambiente e foi diluído em 30 µl de tampão TE. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e quantificado em espectrofotômetro de luz ultravioleta (fig. 6). O material foi conservado em temperatura de 4 °C até a utilização.

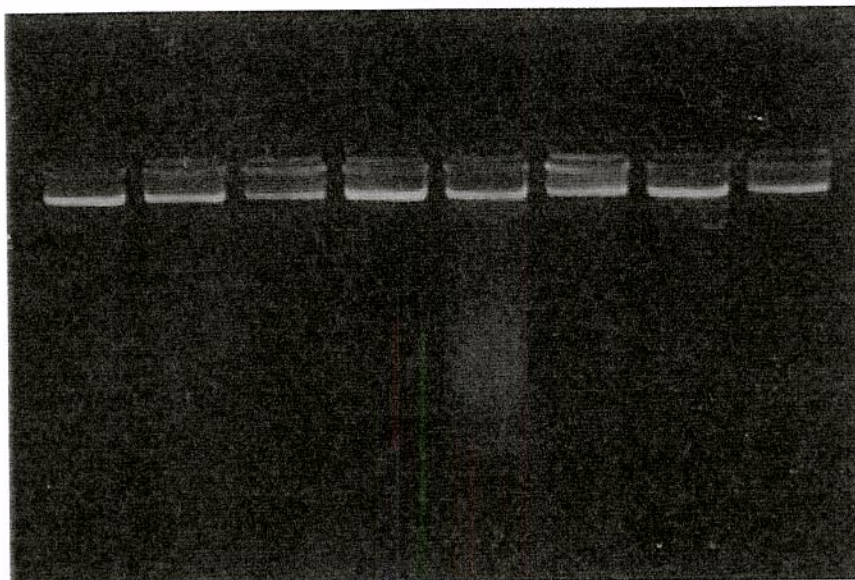


Fig. 6 – DNA de alto peso molecular, extraído de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

3.2.3.2- Digestão do DNA cromossômico por enzima de restrição (*PvuII*)

Nesta etapa, utilizaram-se 2µg do DNA extraído, e adicionou-se a enzima de restrição *PvuII*, ajustando-se o volume final para 20 µl. A digestão foi realizada incubando-se as amostras de DNA durante um período de 4 horas, à temperatura de 37°C, em banho-maria. Acrescentaram-se 5 µl de azul de bromofenol e, após homogeneização com o produto da digestão, 5µl da amostra foi aplicada em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE, submetido a uma corrente de 100 V por 15 min para rápida estimativa do padrão da digestão (Fig. 7).

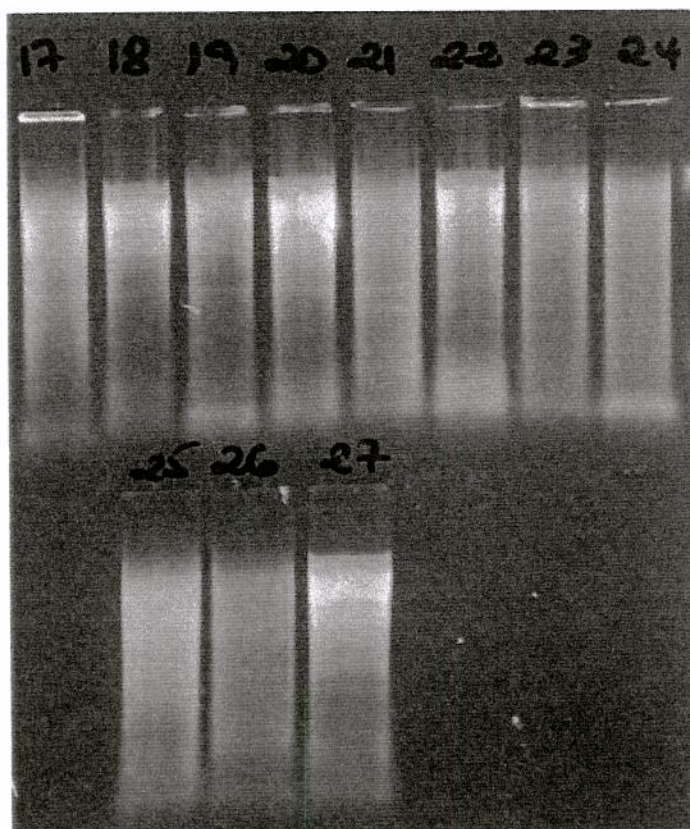


Fig. 7 – Digestão do DNA com a enzima *PvuII*

3.2.3.3- Gel para o “southern blotting”

O gel foi preparado com agarose a 1%, em tampão TAE, e adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml).

As amostras a serem investigadas foram aplicadas em canaletas individuais. Duas posições foram ocupadas por DNA da cepa Mtb 14323 (cepa de referência, cujo número e tamanhos das bandas são conhecidos van EMBDEN,1993). A eletroforese foi feita em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), utilizando-se uma corrente de 100V por 10 minutos, inicialmente, e reduzida a 25V, deixando por cerca de dezoito horas. Ao final do processo, a separação foi documentada por fotografia (Fig. 8).

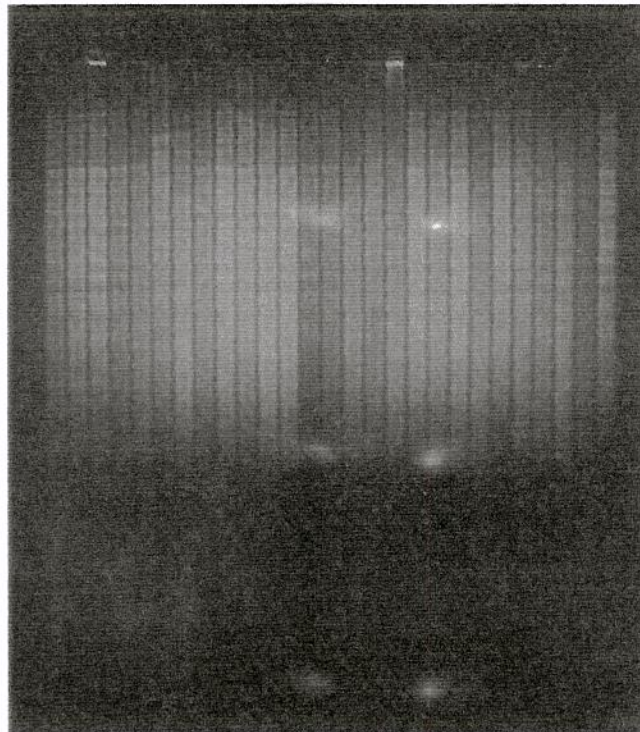


Fig 8 - Gel após 18h de corrida.

3.2.3.4- Transferência do DNA (“blotting”).

Deixou-se o gel de agarose, após a eletroforese, exposto por 5 min à luz ultravioleta. O gel foi então tratado com solução de HCl 0,25M, lavado com H₂O e desnaturado com solução de NaOH 0,4M sob agitação. O DNA foi transferido do gel para uma membrana de náilon polarizada (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech) por capilaridade em solução desnaturante de NaOH 0,4M.

3.2.3.5- Marcação da sonda, hibridização e revelação.

Foi empregada técnica não radioativa (“ECL Direct DNA Labeling and Detection System, Amersham Pharmacia Biotech”) conforme recomendação do fabricante. Nessa técnica, a sonda purificada, conjugada com uma peroxidase é hibridizada com o DNA fixado na membrana de náilon por incubação, por uma noite, em forno de temperatura constante (62° C) e sob agitação. A membrana foi lavada e o reagente de detecção (substrato) adicionado à sua superfície. Foi então exposta a filme convencional de raios X, por cerca de 20 minutos, e o filme foi revelado por técnica fotográfica padronizada.

3.2.4- Análise dos perfis genotípicos

Os perfis genotípicos foram determinados e comparados, com base no número e no tamanho das bandas (pb), tomadas em relação à cepa padrão, cujos tamanhos de banda são conhecidos. Foi utilizado equipamento (Estação de trabalho SUN) e “software” adequados a essa análise (Programa Análise de Bandas BioImage, versão 3.2, Ann Arbor, Michigan). Além das comparações internas, as cepas foram comparadas a um banco de genótipos (Anexo 3). Essa etapa foi gentilmente executada no “Institute for the Study of Human Bacterial Pathogenesis, Department of Pathology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA (Hanna Soini, BSC)” (Fig. 9).

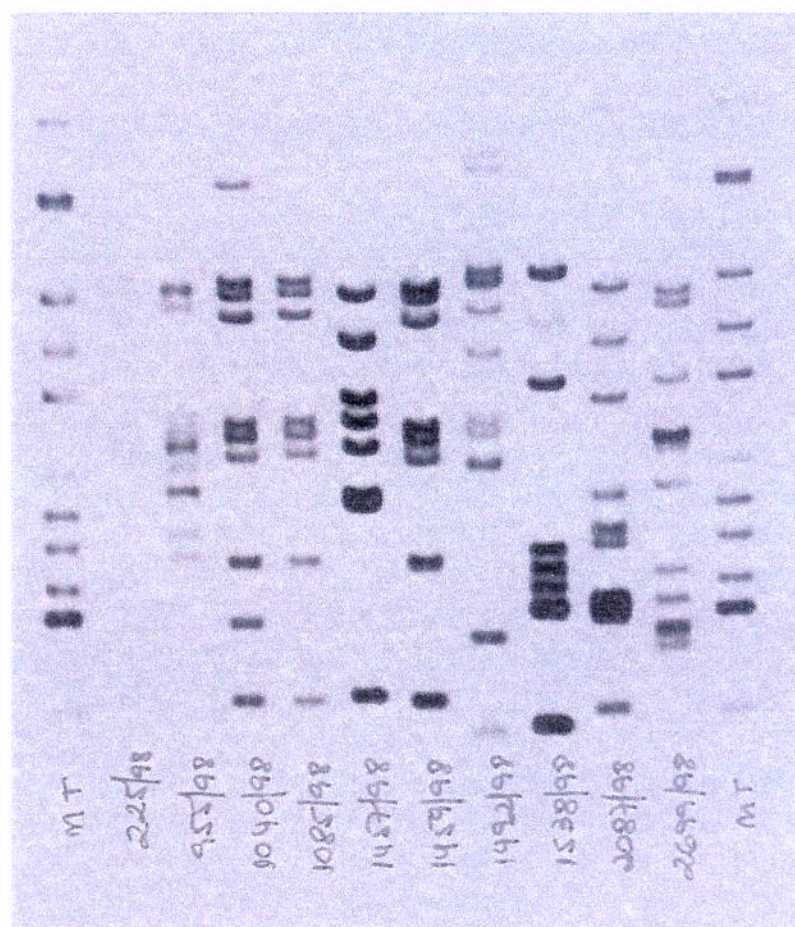


Fig 9 – Filme de raios X para análise do padrão de bandas



4- RESULTADOS

Durante o período de estudo de Janeiro de 1996 à Março de 1999 foram notificados 1037 casos de tuberculose, deste total 561 com tuberculose pulmonar sendo que 280 casos (50%) apresentaram baciloscopia positiva.

Com base nos critérios de seleção adotados, foram identificados e incluídos no estudo 98 pacientes portadores de tuberculose pulmonar. Esses indivíduos apresentaram pesquisa e cultura do escarro positivas para bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), posteriormente identificadas através da técnica Gen-Probe/Accuprobe como sendo cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Esses pacientes consultaram os serviços de emergência, moléstias infecciosas e pneumologia do Hospital das Clínicas da Unicamp no período de janeiro de 1996 a março de 1999. Todos eles eram procedentes da região de Campinas, zona de abrangência do referido hospital.

Na Tabela 1 pode ser vista a distribuição dos pacientes estudados, segundo o sexo e idade. A maior parte deles era do sexo masculino, distribuídos em grupos etários de mais de 20 anos. Em dois casos, não se pôde determinar a idade, já que o atendimento foi feito no setor de emergência e, nesses casos, às vezes não se tem o registro completo das variáveis individuais do paciente.

Tabela 1- Distribuição dos indivíduos estudados segundo o sexo e a idade no estudo do perfil genotípico de cepas de *M.tuberculosis* isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar, Campinas, 2003.

Idade	Masc	Fem	Total
< 10	1	0	1
10-20	3	3	6
21-30	15	12	27
31-40	14	13	27
41-50	13	4	17
> 51	13	5	18
Ignorado	2	-	2
TOTAL	61	37	98

Infelizmente, não se conseguiu genotipar todas as cepas dos pacientes envolvidos no estudo. Em algumas delas (n=22), em virtude do tempo de armazenamento e das ressemeaduras, seu DNA foi degradado ou a cultura sofreu a contaminação com outros microrganismos. Entretanto, em 76 casos, puderam ser determinados os genótipos. Na Tabela 2 é apresentada a distribuição dos indivíduos analisados, segundo o ano do diagnóstico e se pode ou não ser realizado o RFLP. Percebe-se de sua análise que as cepas mais antigas (de 1996) foram as que apresentaram mais problemas. Algumas dessas cepas poderiam não ser portadoras da sequência de inserção pesquisada, porém essa frequência é sabidamente baixa, o que torna pouco provável que todas não tenham a citada sequência e sim que houve problema relacionado ao armazenamento.

Tabela 2- Distribuição dos indivíduos estudados, segundo o ano do diagnóstico e se foi (com RFLP) ou não (sem RFLP) obtido o genótipo da cepa, no estudo do perfil genotípico de cepas de *M.tuberculosis* isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar, Campinas, 2003.

Ano	Com RFLP	Sem RFLP	Total
1996	11	15	26
1997	28	1	29
1998	25	6	31
1999	12	-	12
Total	76	22	98

Na Tabela 3 e Gráfico 1, apresenta-se a distribuição dos pacientes cujos isolados puderam ser genotipados e o seu estado com respeito à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. Note-se que diversos deles não tiveram a pesquisa dos anticorpos anti-HIV realizada. Na época desses atendimentos não havia um consenso acerca da realização rotineira dessa sorologia nos pacientes portadores de tuberculose, hoje a solicitação dela é praticamente rotina, visto que é freqüente a co-infecção por tuberculose em indivíduos infectados pelo HIV.

Tabela 3- Distribuição dos indivíduos estudados, segundo o ano do diagnóstico e se eram ou não infectados pelo HIV, no estudo do perfil genotípico de cepas de *M.tuberculosis* isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar, Campinas, 2003.

Ano	HIV+	HIV-	Não real.	Total
1996	4	2	5	11
1997	5	10	13	28
1998	4	11	10	25
1999	2	6	4	12
Total	15	29	32	76

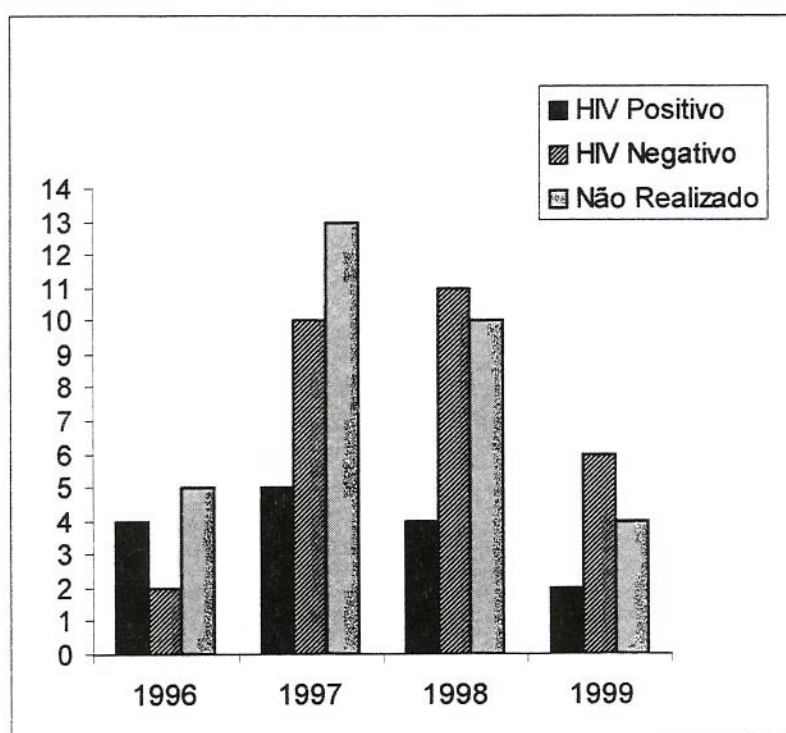


Gráfico 1- Distribuição dos indivíduos estudados, segundo o ano do diagnóstico e se eram ou não infectados pelo HIV, no estudo do perfil genotípico de cepas de *M.tuberculosis* isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar, Campinas, 2003.

No Gráfico 2 pode-se observar a distribuição das cepas genotipadas, segundo o número de seqüências de inserção *IS6110* observadas. Nesse mesmo histograma, estão assinalados os agrupamentos de genótipo idêntico (“clusters”). Em alguns casos, esses agrupamentos correspondem a uma só cepa, por apresentarem identidade com isolados observados em outros estudos e pertencentes ao banco de genótipos do Institute for the Study of Human Bacterial Pathogenesis, Department of Pathology, Baylor College of Medicine.

Cinquenta e nove isolados revelaram um perfil genotípico particular, enquanto outros quinze puderam ser agrupados em 5 “clusters” distintos. O número de cópias por genoma de seqüências de inserção *IS6110*, encontrado por clone, variou de 6 a 21 cópias, sendo que a maioria deles apresentou de 8 a 11 cópias. Não foi encontrado nenhum perfil com menos de 5 bandas, portanto, todos os isolados puderam ser analisados. Esses perfis genotípicos obtidos foram comparados ao já citado banco de dados do Institute for the Study of Human Bacterial Pathogenesis, Department of Pathology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA. Encontraram-se 6 isolados que apresentaram perfis genotípicos idênticos aos de cepas isoladas nos Estados Unidos, a saber: 3 cepas com o padrão arbitrariamente designado como “137” encontrada em Houston, 1 isolado com padrão “Z” encontrado em El Paso e Juarez (cidades do Texas próximas à fronteira Mexicana), 2 isolados com padrão “AZ”, encontrado em Nova York.

Os isolados encontrados em outros 11 pacientes restantes foram agrupados em novos conglomerados brasileiros e que foram arbitrariamente designados como se segue: 2 pacientes com padrão “BE”, 6 pacientes com padrão “BF” e 2 pacientes com padrão “BH”. O padrão “AK”, isolado de uma paciente é o mesmo encontrado durante uma contaminação cruzada, ocorrida no Laboratório de Micobactérias do Departamento de Patologia Clínica, ocorrido em 1995 (RAMOS *et al.* 1999). O diagnóstico desta paciente foi realizado em 1998 e não foi encontrado nenhum indício de contato entre ela e o caso índice daquele pseudo-surto.

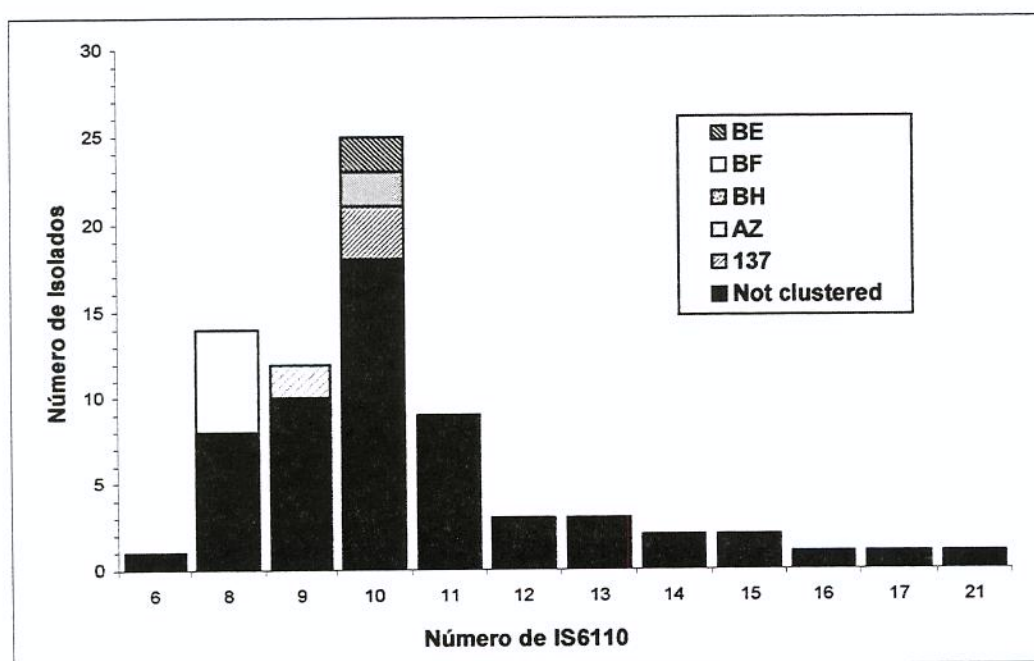


Gráfico 2- Distribuição do número de cepas isoladas, segundo o número de seqüências IS6110 encontradas e os agrupamentos (conglomerados).

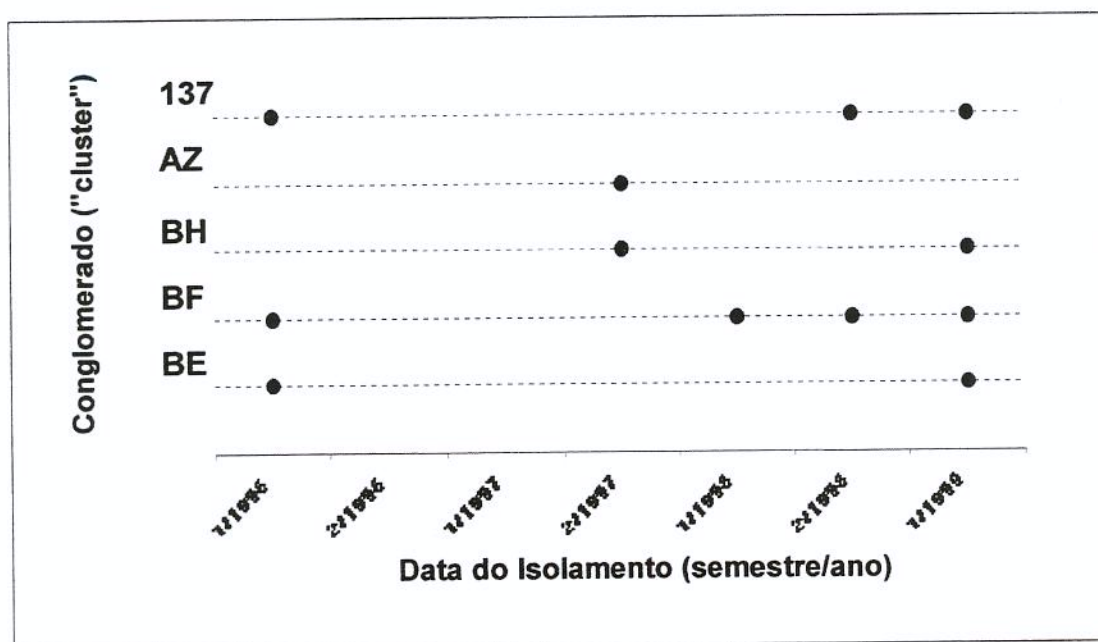


Figura 10- Distribuição das cepas agrupadas, segundo a data do isolamento e o conglomerado (“cluster”).

Na Figura 10 está representada a distribuição dos conglomerados encontrados por semestre nos anos de estudo. Pode-se observar que apenas o conglomerados “AZ” foi descrito em apenas um semestre de 1997 e que representantes de todos os demais conglomerados puderam ser recuperados ao longo de todo o período do estudo.

Na Tabela 4 pode-se observar que há um pequeno número de pacientes infectados pelo HIV e que puderam ser agrupados em conglomerados, quando comparados aos pacientes não infectados pelo HIV. Esse achado contraria algumas observações que registram uma maior transmissibilidade, portanto maior número de infecções recentes entre os pacientes infectados pelo HIV. Este dado talvez pudesse ser modificado com o aumento do número de cepas analisadas de pacientes com sorologia positiva anti-HIV.

Tabela 4- Distribuição dos indivíduos estudados, segundo o estado de infecção pelo HIV e se pertenciam ou não a conglomerados, no estudo do perfil genotípico de cepas de *M.tuberculosis* isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar, Campinas, 2003.

HIV	Agrupados (em “clusters”)	Não Agrupados	Total
Positivo	2	13	15
Negativo	10	19	29
Não Realizado	5	27	32
Total	17	59	76

As Figuras 11, 12, 13 e 17 apresentam os genótipos dos conglomerados encontrados no Brasil e as Figuras 14, 15 e 16 apresentam aqueles cujos genótipos foram encontrados no banco de dados do Institute for the Study of Human Bacterial Pathogenesis, Department of Pathology, Baylor College of Medicine. Na primeira pista de cada figura, pode-se observar a cepa padrão MT14323, gentilmente cedida pelo Instituto Adolfo Lutz, para que a corrida fosse normalizada e permitisse a comparação dos resultados internamente (no estudo) e com os genótipos da coleção pesquisada.

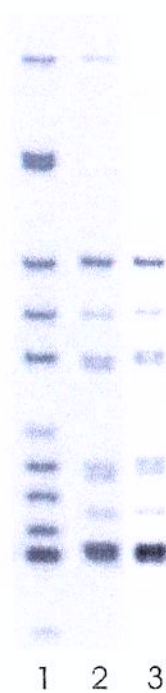


Figura 11– Linha 1 cepa padrão MT14323, linhas 2 e 3 padrão “BE”, genótipo obtido de cepas de pacientes com tuberculose pulmonar, atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp, Campinas 2003.

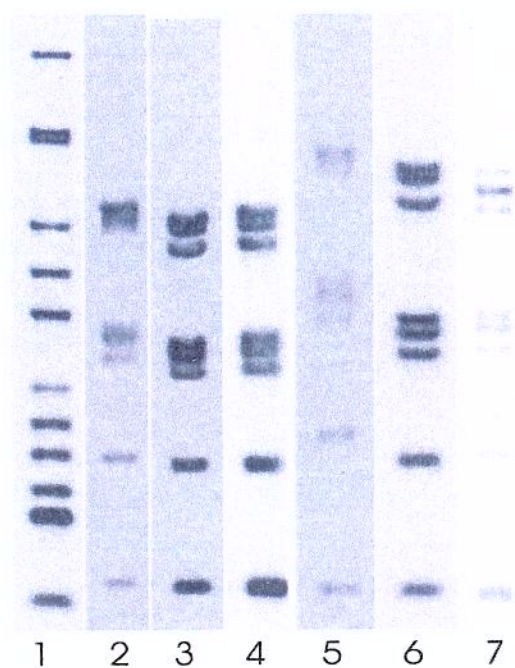


Figura 12– Linha 1 cepa padrão MT14323, linhas 2 a 7 padrão “BF”, genótipo obtido de cepas de pacientes com tuberculose pulmonar, atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp, Campinas 2003.



Figura 13– Linha 1 cepa padrão MT14323, linhas 2 e 3 padrão “BH”, genótipo obtido de cepas de pacientes com tuberculose pulmonar, atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp, Campinas 2003.

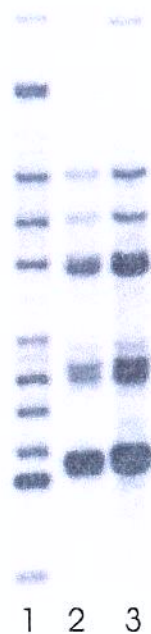


Figura 14– Linha 1 cepa padrão MT14323, linhas 2 e 3 padrão “AZ”, genótipo obtido de cepas de pacientes com tuberculose pulmonar, atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp, Campinas 2003.

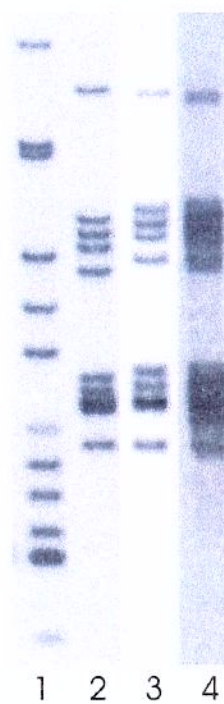


Figura 15— Linha 1 cepa padrão MT14323, linhas 2, 3 e 4 padrão “137”, genótipo obtido de cepas de pacientes com tuberculose pulmonar, atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp, Campinas 2003.



Figura 16– Linha 1 cepa padrão MT14323, linha 2 padrão “Z”, genótipo obtido de cepas de pacientes com tuberculose pulmonar, atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp, Campinas 2003.



Figura 17– Linha 1 cepa padrão MT14323, linha 2 padrão “AK”, genótipo obtido de cepas de pacientes com tuberculose pulmonar, atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp, Campinas 2003.



5- DISCUSSÃO

A caracterização de microrganismos, em níveis mais detalhados do que as espécies, tem sido possível com as técnicas atuais de estudo da composição do DNA. Essas ferramentas são, hoje, essenciais para a epidemiologia das doenças infecciosas. Quando se trata da tuberculose, a contribuição dessas técnicas é ainda mais impressionante. Estão definitivamente estabelecidos os atributos de análises moleculares do DNA genômico do *M. tuberculosis*, tais como: o estudo do número e localização de seqüências de inserção e a espoligotipagem, para citar algumas. Consegue-se, através delas, estabelecer a cadeia de transmissão desse microrganismo, com base na caracterização de clones, levando à identificação de conglomerados (= "clusters" - agrupamentos de cepas isoladas de indivíduos que possuem algum nexos com respeito à transmissão da doença). As conclusões de estudos desse tipo ultrapassam a investigação epidemiológica clássica, limitada pela ocultação, em situações especiais, de antecedentes e relações pessoais impenetráveis.

Diversos têm sido os exemplos nesse sentido. Em estudo realizado em Baltimore, USA, BISHAI *et al.* (1998) mostraram que, de 184 casos de tuberculose diagnosticados e com cultura positiva, 84 deles puderam ser reunidos em conglomerados ("clusters"), tendo sido 58 casos definidos como infecção recente. Sem as técnicas moleculares, só 32% haviam sido assim caracterizados. Nesse mesmo trabalho, a investigação epidemiológica clássica revelou nexos de transmissão em apenas 20 casos. Esses resultados tornam clara a importância da aplicação dos métodos de genotipagem na investigação epidemiológica. Destaca-se ainda o fato de que no local do estudo adota-se a Terapia Diretamente Observada (DOTS), que, sabidamente, contribui para uma investigação epidemiológica mais minuciosa. Concluindo, o autor assinala que a transmissão recente é a maior responsável pelos casos de tuberculose em Baltimore e está restrita a locais como os apontados. Essas conclusões são valiosas para estabelecer uma política de interrupção da transmissão local de casos. (BISHAI *et al.* 1998).

Na França, em 1995, GUTIERREZ *et al.* investigaram a transmissão do *M. tuberculosis* em 272 casos com cultura positiva. O estudo mostrou que a transmissão entre os indivíduos moradores de rua é intensa. Nesses casos, grandes conglomerados de transmissão recente puderam ser observados, também caracterizados pela epidemiologia molecular.

A genotipagem também se presta a desvendar casos em que ocorre a contaminação de materiais clínicos que são processados em laboratórios de isolamento e cultivo de micobactérias. Recentemente, 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.

Na Dinamarca, BAUER *et al.*, em 1997, também descreveram um pseudo - surto de tuberculose. A contaminação foi demonstrada através da identidade genotípica entre os isolados.

As cepas de *M. tuberculosis* isoladas no nosso trabalho foram, na sua maioria, obtidas de pacientes do sexo masculino e adultos, portadores de tuberculose pulmonar, forma comum e contagiosa da doença. Tomou-se cuidado de incluir, nessa análise, apenas aqueles casos que também apresentaram a pesquisa direta do agente positiva no escarro, o que diminui consideravelmente a possibilidade de incluir casos de contaminação laboratorial. O diagnóstico foi, portanto, feito com exatidão e baseado em critérios clínicos e laboratoriais microbiológicos.

Os pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (aids) constituíram um grupo significativo em relação ao total analisado, reforçando a associação já descrita da aids com a tuberculose. Nesses casos, principalmente, a doença pode resultar de uma infecção exógena, portanto recente, ou da reativação de uma infecção adquirida no passado, caracterizando-a como doença de origem endógena. Os critérios clínicos para distinguir essas duas situações não apresentam sensibilidade elevada. Na aids, essa dificuldade é ainda maior, pois os pacientes têm tanto maior chance de adoecer por infecções recentes quanto por recidiva de infecções passadas. Na maioria dos anos do nosso estudo, cerca da metade dos indivíduos com tuberculose em que se dispunha da sorologia anti-HIV, esta era positiva.

De fato, a tuberculose acompanha a aids, conforme mostram as estatísticas do Ministério da Saúde do Brasil. (BRASIL, 1998). Na cidade de São Paulo, a maior da América do Sul, são registrados mais de 5 000 novos casos de tuberculose ao ano. Ainda,

segundo a OMS, o Brasil está entre os 13 países que notificam 75% dos casos de tuberculose de todo o mundo.

Segundo FERRAZOLI *et al.* (2000), em estudo feito em São Paulo, capital, a tuberculose também é a segunda co-morbidade mais comum em pacientes com aids, ficando a candidíase oral em primeiro lugar. De acordo com esse estudo, foram diagnosticados 293 casos de tuberculose num período de 2 anos. Em 32% dos casos, os pacientes apresentavam infecção recente, com base na análise genômica realizada.

Há controvérsias acerca dos mecanismos de produção da doença (exógeno ou endógeno) que predomina em indivíduos com aids, segundo a incidência local da tuberculose. Teoricamente, em países desenvolvidos, onde a incidência da doença se manteve baixa por um tempo longo, as infecções recentes e ocorridas a partir da introdução de casos índice importados, devem corresponder a um significativo número de casos, talvez tanto quanto às reativações. Nos países em desenvolvimento, a transmissão é extremamente facilitada pelas condições inadequadas de assistência, bem como pelas condições sociais, portanto, a doença de aquisição recente deve ser responsável pela maioria dos casos, bem como a quantidade de recidivas também ser expressiva.

Essa questão foi enfocada por ALLAND, (1994) que, baseando-se em comentário de que mais de 90% dos casos de tuberculose nos Estados Unidos deveriam ser provocados por reativações, realizou estudo empregando a genotipagem. Concluiu que as infecções recentes representaram 40% de todos os casos ocorridos na cidade de Nova Iorque, contrariando opiniões anteriores.

Dos casos analisados no nosso estudo, 19% puderam ser alocados em conglomerados, o que significa que o mesmo isolado foi encontrado em mais de um indivíduo, em diversas ocasiões. Esses casos, portanto, podem ser rotulados de infecções recentes (transmitidos pessoa-a-pessoa). Além disso, algumas das cepas de determinado conglomerado foram isoladas de pacientes em intervalos de tempo tão grandes como quase três anos.

Dos casos reunidos em conglomerados a maioria encontrava-se nos grupos etários de 20 a 49 anos. De fato, a taxa de conglomeração pode ser maior ou menor em função da idade da população estudada, como assinala van SOOLINGEN (1999a), da abrangência do estudo (população de estudo) e do período analisado. Segundo esse autor, houve 46% de conglomeração e a transmissão ativa da tuberculose foi estimada em 35% dos casos na população holandesa, em estudo realizado no período de 1993 a 1997.

Em trabalho publicado por van RIE *et al.* (1999), realizado em duas comunidades suburbanas da Cidade do Cabo, África do Sul, o número de casos de tuberculose relatados por ano é bastante alto, cerca de 1000 casos por 100.000 habitantes. Dos 16 pacientes estudados, 12 possuíam padrão inicial de RFLP diferentes do padrão encontrado após reincidência da doença. Este achado indica que a reinfeção pode ser a causa da tuberculose, mesmo após um tratamento que produziu cura. Dois desses pacientes apresentaram reinfeção por cepa multirresistente aos quimioterápicos. Nenhum dos pacientes incluídos eram infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (van RIE *et al.*, 1999).

Os surtos de tuberculose entre pacientes com aids tem sido freqüentemente relatados. FERRAZOLI *et al.* 2000, estudando uma população de pacientes da cidade de São Paulo, infectados ou não pelo HIV, relata que o número de pacientes reunidos em conglomerados no grupo com aids foi significativamente maior do que entre os não infectados, inclusive em um deles, seis casos tratavam-se de infecção recente em pacientes com antecedente de tuberculose tratada ou resistência ao tratamento empregado.

Embora o este estudo não tenha sido desenhado com esse propósito, o número de conglomerados entre pacientes infectados pelo HIV (13%) foi menor do que entre os não infectados (66%). Tal achado pode dever-se ao grande número de pacientes sem sorologia disponível e também pelo pequeno número de cepas selecionadas para o estudo.

A análise do isolamento das cepas reunidas em conglomerados em relação ao tempo do estudo, revelou que, algumas delas, puderam ser cultivadas com intervalos grandes, de até quase três anos, conforme já assinalado. A persistência desse isolamento deve-se, provavelmente, à presença de casos infectados por esse clone durante todo o

tempo do estudo e que não foram atendidos no Hospital das Clínicas ou foram ou não vistos em outro serviço de saúde. Pode-se dizer, com base nesses resultados que, determinadas cepas, podem manter-se na comunidade por longos períodos, provocando casos de doença ao longo do tempo indicando que estas cepas mantiveram-se na comunidade, apresentando então uma infecção recente.

Na população estudada, não foram encontradas cepas com menos de 5 cópias da IS6110. Portanto, não houve necessidade de utilizar métodos de genotipagem adicionais ao empregado.

Os dados coletados acerca do perfil genotípico dessas cepas, adotando um método universal, permite a comparação com isolados de outros locais, inclusive de países diferentes, o que permite conclusões acerca da disseminação global do *M. tuberculosis*. (van SOOLINGEN 2001).

Nesse trabalho foram encontradas 6 cepas homólogas a outras encontradas nos Estados Unidos e constantes do banco de dados de Houston. Esse achado acrescenta à opinião de outros autores acerca da disseminação global do *M. tuberculosis*, no qual o Brasil pode, portanto, ser incluído. Desses isolados, dois são homólogos a cepas encontradas em Nova Iorque e outras quatro em cidades do Texas.

O mapeamento do genoma de algumas cepas de *M.tuberculosis* já foi feito. Trata-se de um único cromossomo, composto de 4.000.000 de bases e um número reduzido e conservado de genes. Além dessa fantástica descoberta, há a informação de que esse microrganismo é de evolução relativamente jovem (adaptou-se ao parasitismo humano, recentemente, em relação a outras *Monera*).

Trata-se, portanto, de um organismo de evolução recente e de disseminação global mais recente ainda.

SREEVATSAN *et al.* (1997), assinalam, baseados na revelação do código genético de cerca de duas megabases, que podem ser caracterizados três genótipos evolutivos de *M. tuberculosis* e que aqueles do tipo 3 não estão associados com frequência a conglomerados e que, portanto, o organismo deve estar evoluindo para um estado de transmissibilidade e virulência reduzida.

A genotipagem pelo RFLP com a IS6110 não é um indicador completamente confiável de que exista um nexo epidemiológica entre os casos de tuberculose. Como em estudo descrito por BRADEN *et al.* (1997), que em uma população rural de Arkansas encontrou cepas com padrão idêntico de bandas em pacientes idosos de uma extensa área geográfica, que nunca estiveram em contato (BRADEN et al 1997, van SOOLINGEN 2001).

Estudos como esse, utilizando técnicas padronizadas de genotipagem poderão contribuir para a maior compreensão da dinâmica e evolução do *Mycobacterium tuberculosis* em populações humanas, à medida que esses genótipos sejam comparados com outros bancos de dados internacionais, podendo assim presumir a distribuição do *Mycobacterium tuberculosis* no mundo.



6- CONCLUSÕES

- a.) Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas na região de Campinas podem ser analisadas por métodos genotípicos que utilizam a seqüência de inserção IS 6110 como alvo. Os exemplares utilizados em nosso estudo possuíam, na sua maioria entre 5 a 10 seqüências desse tipo, possibilitando a análise epidemiológica adequada por este método.
- b.) Em 19% dos casos incluídos no estudo, as infecções possivelmente possam ser consideradas recentes, com base na caracterização de conglomerados.
- c.) Determinados clones de *M. tuberculosis* permanecem na comunidade, causando doença por longo período de tempo. A genotipagem realizada mostrou que faz parte da história natural da tuberculose a transmissão ininterrupta de determinados isolados.
- d.) Cepas de *M. tuberculosis* isoladas no Brasil podem ser consideradas de disseminação global, já que genótipos idênticos puderam ser observados em isolados norte americanos.
- e.) A aids esteve associada à tuberculose, nos casos analisados, durante todo o tempo do estudo.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAND, D.; KALKUT, G. E.; MOSS, A. R.; MCADAM, R. A.; HAHN, J. A.; BOSWORTH, W.; DRUCKER, E.; BLOOM, B. R. - Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med*, **330**: 1710-16, 1994.

BAUER, J.; ANDERSEN, A. B.; KREMER, K.; MIORNER, H. - Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol*, **37**: 2602-06, 1999.

BISHAI, W. R.; GRAHAM, N. M. H.; HARRINGTON, S.; POPE, D. S.; HOOPER, N.; ASTEMBORSKI, J.; SHEELY, L.; VLAHOV, D.; GLASS, G. E.; CHAISSON, R. E. - Molecular and geographic patterns of tuberculosis transmission after 15 years of directly observed therapy. *JAMA*, **280**: 1679-84, 1998.

BRADEN, C. R.; TEMPLETON, G. L.; CAVE, M. D.; VALWAY, S.; ONORATO, I. M.; CASTRO, K. G.; MOERS, D.; YANG, Z.; STEAD, W. W.; BATES, J. H. - Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J. infect. Dis*, **175**: 1446-52, 1997.

BRASIL. - **Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica** 4ª. ed. rev. ampl. Brasília, DF, 1998. cap 5.34, p1-13.

BURGER, M.; RASKIN, S.; BROCKELT, S. R.; AMTHOR, B.; GEISS, H. K.; HAAS, W. H. - DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex culture isolates collected in Brazil and spotted onto filter paper. *J Clin Microbiol*, **36**: 573-6, 1998.

CAVE, M. D.; EISENACH, R. D.; McDERMOTT, P. F.; BATES, J. H.; CROWFORD, J. T. - IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and in its utilization in DNA fingerprinting. *Mol. Cell Probes*, **5**: 73-80, 1991.

DAS, S.; CHAN, S. L.; ALLEN, B. W.; MITCHISON, D. A.; LOWRIE, D. B. - Application of DNA fingerprinting with IS986 to sequential mycobacterial isolates obtained from pulmonary tuberculosis patients in Hong Kong before, during and after short-course chemotherapy. *Tuber Lung Dis*, **74**: 47-51, 1993.

DE LA SALMONIÈRE, Y. O. G.; LI, H. M.; TORREA, G.; BUNSCHOTEN, A.; VAN EMBDEN, J.; GICQUEL, B. - Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, **35**: 2210-14, 1997.

DIAZ, R.; KREMER, K.; HASS, P. E.; GOMEZ, R. I.; MARRERO, A.; VALDIVIA, J. A.; van EMBDEN, J. D. A.; van SOOLINGEN, D. - Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994 – June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis*, **2**: 743 – 50, 1998.

ELLNER P. D.; KIRHN T. E.; CAMMARATA R.; HOSMER M. - Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J Clin Microbiol*, **26**: 1349-52, 1988.

FANDINHO, F. C. O.; KRITSKI, A. L.; HOFER, C.; CONDE JR., H.; FERREIRA, R. M. C.; SAAD, M. H. F.; SILVA, M. G.; RILEY, L. W.; FONSECA, L. S. - RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brasil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **94**: 271-75, 2000.

FANG, Z.; MORRISON, N.; WATT, B.; DOING, C.; FORBES, K. J. - IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Bacteriol*, **180**, 2102-09, 1998.

FERRAZOLI, L.; PALACI, M.; MARQUES, L. R. M.; JAMAL, L. F.; AFIUE, J. B.; CHIMARA, E.; MARTINS, M. C.; TELES, M. A. S.; OLIVEIRA, C. A. F.; PALHARES, M. C.; SPADA, D. T. A.; RILEY, L. W. - Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis*, **4**: 18-25, 2000.

GARCIA, L. P.; FERRERA, A.; HOFFNER, S. E. - DNA Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Honduras. *J Clin Microbiol*, **35**: 2393-97, 1997.

GOYAL, M.; SAUNDERS, N. A.; VAN EMBDEN, J. D.; YOUNG, D. B.; SHAW, R. J. - Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol*, **35**: 647-51, 1997.

GUTIÉRREZ, M. C.; VICENT, V.; AUBERT, D.; BIZET, J.; GAILLOT, O.; LEBRUN, L.; et al - Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surround area. *J Clin Microbiol*, **36**: 486-92, 1998.

HAAS, W. H.; BUTLER, W. R.; WOODLEY, C. L.; CRAWFORD, J. T. - Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, **31**:1293-98, 1993.

HEIFITS, L. B. *Clinics in Laboratory Medicine. Clinical Mycobacteriology*, **16**: 513-25

HERMANS, P. W. M.; van SOOLINGEN, D.; DALE, J. W.; SCHUITEMA, A. R. J.; McADAM, R. A.; CATTY, D.; van EMBDEN, J. D. A. - Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, **28**: 2051-58, 1990.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; van AGTERVELD, M.; van SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; van EMBDEN, J. D. A. - Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology *J Clin Microbiol*, **35**: 907-14, 1997.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5ed. Philadelphia, Lippincott, 1997. p. 893-938.

KREMER, K.; van SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W. H.; HERMANS, P. W. M.; MARTÍN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M.; van EMBDEN, J. D. A. - Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol*, **37**: 2607-18, 1999.

MARIANI, F.; PICCOLELLA, E.; COLIZZI, V.; RAPPUOLI, R.; GROSS, R. – Characterization of an IS-like element from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microbiol*, **35**: 273-77, 1997.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. – **Manual of Clinical Microbiology**. 6th ed, Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999. p. 400-30.

RAMOS, M. C.; SOINI, H.; ROSCANI, G. N.; JAQUES, M.; VILLARES, M. C.; MUSSER, J. M. - Extensive Cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. *J Clin Microbiol*, **37**: 916-19, 1999.

SAHADEVAN, R.; NARAYANAN, S.; PARAMASIVAN, C. N.; PRABHAKAR, R.; NARAYANAN, P. R. - Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. *J Clin Microbiol*, **33**: 3037-39, 1995.

SREEVATSAN, S.; PAN, S.; STOCKBAUER, K. E.; CONNEL, N. D.; KREISWIRTH, B. N.; WHITTHAM, T. S.; MUSSER, J. M. - Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 9869-74, 1997.

THIERRY, D.; BRISSON-NOEL, A.; VINCENT-LÉVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J. L.; GICQUEL, B. - Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*, **28**: 2668-73, 1990.

van EMBDEN, J. D. A.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J. T.; DALE, J. W.; EISENACH, K. D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; McADAM, R.; SHINNICK, T. M.; SMALL, P. M. - Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology *J Clin Microbiol*, **31**: 406-9, 1993.

van RIE, A.; WARREN, R.; RICHARDSON, M.; VICTOR, T. C.; GIE, R. P.; ENARSON, D. A.; BEYERS, N.; van HELDEN, P. D. - Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Méd*, **341**: 1174-79, 1999.

van SOOLINGEN, D. - Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. review. *J of Internal Medicine*, **249**: 1-26, 2001.

van SOOLINGEN, D.; BORGDORFF, M.W.; HAAS, P. E. W.; SEBEK, M. M. G. G.; VEEN, J.; DESSENS, M.; KREMER, K.; van EMBDEN, J. D. A. - Molecular Epidemiology of Tuberculosis in the Netherlands: A Nationwide Study from 1993 through 1997 *J Infect Dis*, **180**: 726-36, 1999a.

van SOOLINGEN, D.; HAAS, P. E. W.; HERMANS, P. W.M.; GROENEN, P. M. A.; van EMBDEN, J. D. A. - Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, **31**: 1987-95, 1993.

van SOOLINGEN, D.; HAAS, P. E. W.; KREMER, K. - Protocol. **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Typing of Mycobacteria**. National Institute of Public Health and Environment. Netherlands, Bilthoven, 1999 b.

van SOOLINGEN, D.; HAAS, P.; PIJNENBURG, J.; KREMER, K.; HERMANS, P.; VAN EMBDEN, J. - **Manual for Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* Strains** National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven, Netherlands, 1996.

van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M. - Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. *Eur Respir J*, **8**: Suppl. 20 , 649s-56s, 1995.

van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M; HAAS, P. E. W.; SOLL, D. R.; van EMBDEN; J. D. - Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, **29**: 2578-86, 1991.

van SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; HAAS, P. E. W.; HERMANS, P. W.M.; KOEDAM, M. A.; TEPPEMA, K. S.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S.; PORTAELS, F.; TOP, J.; SCHOULS, L. M.; van EMBDEN, J. D. A. - A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*, **47**: 1236-45, 1997.

VERONESI, RICARDO & FOCACCIA, ROBERTO (ed), **Veronesi: Tratado de Infectologia**. Atheneu. São Paulo. 1996. 915-59p.

YANG, Z.; CHAVES, F.; BARNES, P. F., BURMAN, W.J., KOEHLER, J.; EISENACH, K. D.; BATES, J. H.; CAVE, M. D. - Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, **34**: 3044-48, 1996.

YANG, Z.; BARNES, P. F.; CHAVES, F.; EISENACH, K. D.; WEIS, S. E.; BATES, J. H. CAVES, M. D. - Diversity of DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol*, **36**: 1003-07, 1998.

YUEN, L. K.; ROSS, B. C.; JACKSON, K. M.; DWYER, B. - Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. . *J Clin Microbiol*, **31**: 1615 – 18, 1993.



8- *ANEXOS*

REAGENTES E SOLUÇÕES

1. Corantes para Ziehl-Neelsen

Fucsina de Ziehl

Fucsina básica.....3g
Ácido Fênico 5%.....900ml

Azul de Metileno 0,3%

Azul de metileno.....3g
H₂O destilada.....1000ml

Álcool ácido 3%

HCL conc.....30ml
Álcool Etilico.....970ml

2. Descontaminação de amostras clínicas

Solução NaOH 4%

NaOH lentilhas.....40g
Sol.vermelho de fenol.....10ml
H₂O destilada.....1000ml

Dissolver o hidróxido de sódio.
Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
Estocar a temperatura ambiente.

Solução Tampão Fosfato pH6,8

a) Solução estoque tampão alcalino.

Na₂HPO₄(anidro).....9,47g
H₂O destilada.....1000ml

b) Solução estoque tampão ácido.

KH₂PO₄.....9,07g
H₂O destilada.....1000ml

Dissolver os sais em um pouco de água e completar o volume final.
Autoclavar a 121°C por 15 minutos.
Estocar em geladeira.

- c) Solução de trabalho.
Colocar volumes iguais das soluções estoque dos tampões
Checar o pH da solução final.
Acertar o pH com os próprios tampões.

3. Meios de cultura para crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*

Meio de Löwenstein-Jensen

Meio Base (DIFCO).....37,5g
Glicerol P.A.....12ml
H₂O destilada.....600ml
Ovos homogeneizados.....1000ml

Autoclavar a base, o glicerol e a água destilada. Deixar resfriar até 50°C para adicionar os ovos homogeneizados de forma estéril sem que haja a formação de bolhas. Distribuir em tubos estéreis e colocá-los em inspissador, inclinados, para coagulação do meio. Deixar sob aquecimento por 45 min a 85°C.

Meio BACTEC 12B (Middlebrook 7H12)

Composição: - caldo Middlebrook 7H9
- hidrolizado de caseína
- albumina bovina
- catalase
- 1µCi/ml de ¹⁴C (4µCi/frasco)
- água deionizada

Panta Plus (solução de antibióticos)

Evita o crescimento de contaminantes.

Composição: - Fluido de reconstituição: H₂O

Esterato de polioxietileno

- Suspensão de antibióticos: Polimixina B
Anfotericina B
Ácido Nalidixico
Trimetropim
Azlocilina

4. Extração de DNA Genômico de Micobactérias

Solução Tris 1M – pH 8,0

Tris base.....121,1g
H₂O deionizada.....800ml

Ajustar o pH para o desejado, adicionando HCl
Acertar o volume para 1000 ml.
Autoclavar

Solução EDTA 0,5M - pH 8,0

EDTA.2H₂O.....186,1g
H₂O deionizada..... 800ml

Dissolva sob agitação, ajuste o pH 8,0 com NaOH.
Acertar volume para 1000 ml.
Autoclavar.

Solução TE 1X – pH 8,0

Solução Tris 1M.....500µl
Solução EDTA 0,5M.....100µl
Completar para 50ml com H₂O deionizada
Autoclavar.

Solução Lisozima

Lisozima.....10mg
H₂O deionizada estéril.....1ml
Estocar a -20° C.

SDS 10%

SDS10g
H₂O deionizada estéril.....100ml
Dissolver sob aquecimento 65°C e agitação por 20 minutos.
Não autoclavar.
Estocar a TA não mais que um mês.

Proteinase K

Proteinase K10mg
H₂O deionizada estéril1ml
Estocar em pequenas alíquotas a -20°C.

Solução SDS / Proteinase K

Proteinase K5µl
SDS 10%70µl

NaCl 5M

NaCl29,2g
H₂O deionizada estéril.....100ml
Autoclavar.
Estocar a TA não mais que um ano.

CTAB / NaCl

Dissolver 4,1g de NaCl em 80ml de H₂O. Sob agitação adicionar 10g de CTAB.
Se necessário, aquecer a solução a 65°C.
Ajustar o volume para 100ml.
Estocar a TA não mais que seis meses.

CLOROFÓRMIO / ÁLCOOL ISOAMÍLICO 24:1

Clorofórmio 24vol
Álcool isoamílico1 vol
Estocar a TA não ultrapassando um ano.

ETANOL 70%

Etanol70ml
H₂O deionizada.....30ml

ACETATO DE SÓDIO 3M

Acetato de Sódio.....40,81g
H₂O deionizada800ml
Ajustar o pH para 5,2 utilizando HCL.
Autoclavar.

5. Separação de fragmentos de DNA por eletroforese

Tampão Tris – borato - EDTA 10X (TBE 10X)

Tris base121,1g
Ácido Bórico anidro61,8g
Na₂EDTA.2H₂O.....7,4g
H₂O deionizada q.s.p.....1000ml
Ajustar pH para 8,3.
Autoclavar.

Tampão Tris – borato - EDTA 1X (TBE 1X)

TBE 10X.....100ml
H₂O deionizada.....900ml

Tampão Tris – acetato – EDTA 50X (TAE 50X)

Tris base.....242g
Ácido Acético Glacial.....57,1ml
Na₂EDTA.2H₂O.....37,2g
H₂O deionizada q.s.p.....1000ml

Tampão Tris – acetato – EDTA 1X (TAE 1X)

TAE 50X20ml
H₂O deionizada.....980ml

Buffer da Amostra 10X

Na₂EDTA.2H₂O.....0,37g
SDS.....0,1g
Azul de Bromofenol.....0,01g
Glicerol.....5ml
H₂O q.s.p.....10ml

Brometo de Etídeo 500µg/ml (1000X)

Brometo de etídeo.....50mg
H₂O deionizada estéril.....100ml

Solução de Trabalho 0,5µg/ml

Brometo de etídeo 1000X.....100µl
H₂O deionizada estéril.....100ml

6. SOUTHERN BLOTTING

Tampão Primário de Lavagem

Uréia.....2g
SDS.....0,8g
SSC 20X.....5 ml
H₂O deionizada q.s.p.....200ml

Não autoclavar.

HCl 1M (estoque)

HCl conc.....85,5ml
H₂O deionizada.....914,5ml

HCl 0,25M

HCl 1M.....125ml
H₂O.....375ml

NaOH 4M (estoque)

NaOH.....160g
H₂O deionizada.....1000ml

Dissolver o NaOH aos poucos em 800ml e depois completar para 1l.

NaOH 0,4M

NaOH 4M.....100ml
H₂O deionizada.....900ml

SSC 20X

NaCl.....175,3g
Na-citrato.....88,2g
H₂O deionizada q.s.p.....1000ml

Ajustar pH 7,0 com NaOH 5M
Autoclavar.

SSC 5X (Dil. 1:3)

SSC 20X.....100ml
H₂O.....300ml

SSC 2X (Dil. 1:9)

SSC 20X.....50ml
H₂O deionizada.....450ml

SSPE 20X

NaCl.....175,3g
NaH₂PO₄.2H₂O.....27,6g
EDTA.....7,4g
H₂O deionizada q.s.p.....1000ml

Dissolver em 800ml de H₂O.

Ajustar pH 7,4 com NaOH e completar o volume para 1000ml.

Autoclavar.

SSPE 2X / 0,1% SDS

SSPE 20X.....100ml
SDS10%.....10ml
H₂O deionizada.....890ml

Tampão de Hibridização

Tampão de hibridização.....50ml
NaCl1,5g
Reagente de bloqueio.....2,5g

Dissolver o NaCl e o reagente de bloqueio em tampão de hibridização sob agitação e aquecimento a 42°C.

STRIP BUFFER**SSPE 2X / 0,5% SDS**

SSPE 20X.....100ml
SDS10%.....50ml
H₂O deionizada.....850ml

Pacientes do Estudo

Nº	Cultura	Nome	Pesq	Material
1	155/96	R O	C3	ESC
2	511/96	MR S	C4	ESC
3	1504/96	L D	C4	ESC
4	1546/96	M R P M	C4	ESC
5	1611/96	JAM	C3	ESC
6	2015/96	BRP	C2	ESC
7	2173/96	LCO	C2	ESC
8	2494/96	OL	C3	ESC
9	4042/96	CTL	C1	ESC
10	4702/96	JO	C3	ESC
11	5541/96	MMS	C2	ESC
12	60/97	VAV	C4	ESC
13	188/97	AS	pos	LBR.
14	271/97	SC	C2	ESC
15	1102/97	HS	Pos	ESC
16	1273/97	SRA	C1	ESC
17	1301/97	GS	C2	ESC
18	1498/97	AJR	C2	ESC
19	2339/97	FGAM	pos	L.G.
20	2955/97	WPJ	C2	ESC
21	2976/97	PSS	C1	ESC
22	3189/97	APS	C1	ESC
23	3428/97	LPS	C3	ESC
24	3528/97	BMT	C3	ESC
25	4035/97	JM	C1	ESC
26	4191/97	ALF	C1	ESC
27	4250/97	SRSS	C1	ESC
28	4294/97	DCS	C3	ESC
29	4304/97	RGLS	C1	ESC
30	4355/97	JRA	C2	ESC
31	4426/97	RFS	C3	ESC
32	4484/97	RA	C1	ESC
33	4699/97	JAIP	C3	ESC
34	4790/97	AGA	C3	ESC
35	4853/97	CBJ	C3	ESC
36	5399/97	JAN	C3	ESC
37	5523/97	AIRS	C4	ESC
38	5605/97	JMJR	C3	ESC
39	5691/97	LGR	C2	ESC
40	225/98	AFD	C2	ESC
41	268/98	EMJ	C1	ESC
42	955/98	JSOF	C2	ESC
43	1040/98	DPC	C2	ESC
44	1085/98	JVS	C1	ESC
45	1320/98	EAS	C4	ESC
46	1457/98	ACM	C2	ESC
47	1459/98	JRAS	C4	ESC
48	1492/98	JG	C1	BAL
49	1538/98	BMCP	C3	ESC
50	2087/98	RMS	C4	ESC
51	2699/98	OAPZ	C3	ESC
52	2923/98	LFL	C3	ESC
53	3024/98	CFF	C1	ESC
54	3078/98	DMV	C2	ESC

Pacientes do Estudo

55	3087/98	DPC	C2	ESC
56	3125/98	GA	C4	ESC
57	3539/98	SMR	C4	ESC
58	3549/98	FAF	C1	ESC
59	3586/98	SAF	C3	ESC
60	3594/98	MA	C2	ESC
61	3875/98	MMO	C3	ESC
62	3979/98	RS	C3	ESC
63	4027/98	NC	C2	ESC
64	4263/98	JCBA	C1	ESC
65	5258/98	TJS	C4	ESC
66	130/99	DHMS	C4	ESC
67	170/99	DCT	C3	ESC
68	342/99	VAS	C3	ESC
69	645/99	JHB	C2	ESC
70	655/99	VRA	C2	ESC
71	685/99	MFFP	C4	ESC
72	691/99	MCM	C2	ESC
73	700/99	EN	C2	ESC
74	866/99	MFL	C3	ESC
75	914/99	PSU	C3	ESC
76	1196/99	JAD	C4	ESC
77	1508/99	ARCJr	C1	ESC

Brazil Fingerprints

Análise de Bandas - BiImage (versão 3.2)				
Isolate#	Blot#	IS6110	Copy#	Comments
155/96	2	137	10	Matches with Houston print 137
1504/96	2	BE	10	New print group
1546/96	2	999	11	
2173/96	2	999	8	
2494/96	2	BF	8	New print group
4042/96	2	999	14	
4702/96	2	999	10	
1611/96	2	999	8	
60/97	3	999	10	
188/97	3	999	11	
271/97	3	999	13	
1102/97	3	999	12	
1273/97	3	999	13	
1301/97	3	999	11	
1498/97	3	999	10	
2955/97	3	999	13	
2976/97	3	999	9	
3428/97	3	999	10	
3528/97	4	999	21	
4035/97	4	Z	13	Matches with non-Houston print Z
4191/97	4	999	16	
4250/97	4	999	8	
4294/97	4	AZ	9	Matches with non-Houston print AZ
4304/97	4	999	17	
4355/97	4	999	9	
4426/97	4	999	10	
4484/97	4	AZ	9	Matches with non-Houston print AZ
4699/97	4	999	12	
130/99	5	BE	10	New print group
170/99	5	999	6	Close to Houston print 11
645/99	5	999	8	
655/99	5	999	15	
685/99	5	999	10	
691/99	5	BF	8	New print group
700/99	5	999	12	
866/99	5	137	10	Matches with Houston print 137
914/99	5	BH	10	New print group
1196/99	5	999	10	Close to print BE
225/98	6	999	10	
955/98	6	999	10	
1085/98	6	BF	8	New print group
1457/98	6	999	8	
1459/98	6	BF	8	New print group
1492/98	6	999	11	
1538/98	6	999	8	
2087/98	6	999	10	
2699/98	6	999	10	
3539/98	7	999	9	
3549/98	7	137	10	Matches with Houston print 137
3586/98	7	999	15	
3594/98	7	AK	9	Matches with Brazil print AK
3979/98	7	999	10	Close to Houston print 155
4027/98	7	BF	8	New print group
5258/98	7	999	9	

Brazil Fingerprints

Isolate#	Blot#	IS6110	Copy#	Comments
1508/99	7	999	11	
342/99	8	999	10	
268/98	8	999	10	
1320/98	8	999	9	
2923/98	8	999	11	
3024/98	8	999	9	
3078/98	8	999	9	
3125/98	9	BF	8	New print group
3875/98	9	999	8	
4263/98	9	999	11	
5691/97	9	999	10	
5605/97	9	999	14	
5523/97	9	999	8	
5399/97	9	999	9	
4853/97	9	BH	10	New print group
4790/97	9	999	9	
5541/96	10	999	10	
2015/96	10	999	10	
511/96	11	999	11	
2339/97	11	999	9	
3189/97	11	999	11	



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 15/04/03
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 132/2003

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLADAS DE PACIENTES PORTADORES DE TUBERCULOSE PULMONAR ATENDIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNICAMP”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ana Lúcia Roscani Calusni

INSTITUIÇÃO: Departamento de Clínica Médica/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 14/04/2003

DATA DE APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIO: 15/04/2004

II - OBJETIVOS

Caracterizar o genótipo através da demonstração do número e localização da sequência variável IS6110 de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

III - SUMÁRIO

Serão analisadas as culturas positivas das amostras de escarro encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Clínica da Divisão de Patologia Clínica do HC UNICAMP no período de 1996 a 1999, obtidas de pacientes com suspeita clínica de tuberculose pulmonar. Serão isolados casos positivos na bacterioscopia pela coloração de Ziehl-Neelsen. Essas cepas cresceram, inicialmente, em meio de cultivo 12B do equipamento BACTEC 460TB e foram a seguir semeadas em meio sólido de Lowenstein Jenssen e incubadas a 37°C até crescimento uniforme. A manutenção da cultura foi realizada com a semeadura da micobactéria em meio de Lowenstein Jenssen, permanecendo em cultivo por aproximadamente 20 dias em estufa e depois congelada a -20°C até a sua utilização. O DNA será extraído pelo método orgânico e submetido a digestão enzimática com a enzima Pvu II. Os polimorfismos serão evidenciados através da utilização de sonda específica da sequência IS6110.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto está bem estruturado, com definição de objetivos e justificativa satisfatórias. O orçamento está adequado, e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

e demais itens do protocolo de Pesquisa estão em conformidade com a Resolução CONEP 196/96. **É importante que a pesquisadora encaminhe ao CEP uma declaração do chefe do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica, liberando a utilização das cepas estocadas, assim como uma declaração assinada pela pesquisadora e seu orientador que qualquer projeto futuro que seja realizado com esse material, o projeto deverá ser primeiro encaminhado ao CEP.**

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar o Protocolo de Pesquisa supracitado, com a condição de entrega dos documentos acima referidos pelo relator.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 15 de abril de 2003.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP