

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**“GENOTIPAGEM POR *SPOLIGOTYPING* E MIRU DE
Mycobacterium tuberculosis PROVENIENTES DE PACIENTES COM
TUBERCULOSE PULMONAR.”**

Natália Helena Mendes

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Clarice Queico Fujimura Leite

ARARAQUARA - SP

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**“GENOTIPAGEM POR *SPOLIGOTYPING* E MIRU DE
Mycobacterium tuberculosis PROVENIENTES DE PACIENTES COM
TUBERCULOSE PULMONAR.”**

Natália Helena Mendes

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Clarice Queico Fujimura Leite

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de mestre
em Biociências e Biotecnologia aplicada à
Farmácia, área de Microbiologia Básica.

ARARAQUARA - SP

2010

Trabalho realizado no Laboratório de Micobactérias “Prof. Dr. Hugo David”, Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araraquara.

Dedicatória

Aos meus pais, Antônio Luiz Mendes e Helena Aparecida Ianagoni Mendes, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pelo amor incondicional, pelo exemplo a ser seguido e por ser simplesmente a minha vida, a minha razão de viver.

Ao meu irmão Alex Luiz Mendes que sempre está sempre ao meu lado, me oferecendo um ombro amigo, uma palavra de consolo e por fim um sorriso para me ajudar a enfrentar todos os obstáculos.

Dedicatória

À Querida Profª Drª Clarice Queico Fujimura Leite por sua imensa compreensão, dedicação, ensinamentos e humildade. Jamais poderei esquecer seu amor maternal e suas palavras de amizade em todos os momentos. Obrigada por acreditar em minha capacidade e por ser mais que uma professora para mim.

Agradecimentos

Em primeiro lugar à Deus por estar em todos os momentos da minha vida, por me conduzir aos caminhos corretos e principalmente por me abraçar, me acolher e me amparar nos momentos de fraqueza e cansaço, não me deixando jamais desistir.

Ao Dr. Fernando Augusto Fuiza de Melo e colaboradores do Instituto Clemente Ferreira, pelas amostras, disponibilidade e atenção durante todo o trabalho.

À Dr^a Daisy Nakamura Sato e o Dr. Paulo da Silva pela amizade, generosidade e pelos momentos de alegrias que passamos juntos.

À Prof^a Dr^a Rosilene Fressatti Cardoso pela amizade, incentivo e apoio sempre que necessário neste trabalho.

Ao Sr. Henri Berghs pela disponibilidade e gentileza na colaboração desse projeto.

À Prof^a Dr^a Juliana Falcão e Prof. Dr. José Rodrigo Cláudio Pandolfi pelas observações realizadas na qualificação.

Às funcionárias da seção de pós-graduação Cláudia Lúcia Molina, Sônia Ornellas Silva e Laura Rosim, pela disposição e dedicação aos alunos.

Às técnicas Sílvia Helena de Oliveira David, Edinéia Fátima Corrêa e Marisa Fernandes, pela amizade.

Aos meus amigos de laboratório Fernando Pavan, Karina Prince, Leonardo Marino, Letícia Sato, Maria Luiza Duarte, Marcelo Miyata, Rodrigo Luiz, pela dedicação, paciência, amizade e pelos momentos inesquecíveis. Aos meus amigos que não estão mais no laboratório, Ana Carolina Fontão, Ana Carolina Malaspina, Faber Katsume e Livia Greggi.

Às minhas fiéis e eternas companheiras Amaitê Belvedere, Mariana Lopes e Silvana Figueira pela amizade verdadeira.

Ao meu eterno amigo e irmão Adolfo Barreto pela imensa colaboração, dedicação e esforço nesse trabalho. Mais que isso, pela amizade sincera, pelas palavras e pelo seu ombro amigo em todos os momentos.

À minha tia mais que especial Alessandra Macchioni pela paciência, amor, carinho e dedicação.

Ao CNPq pelo financiamento do Projeto – Universal 472867/2006-7.

O ser humano vivência a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.

Albert Einstein

Sumário

Lista de tabelas	11
Lista de Quadros	12
Lista de Figuras	14
Lista de Siglas e Abreviaturas	15
Resumo	18
<i>Abstract</i>	19
1. Introdução	20
2. Objetivos	30
2.1 – Geral	30
2.2 – Específicos	30
3. Material e Métodos	31
3.1 - Isolados clínicos	31
3.2 - Diagnóstico Laboratorial	31
3.3 - Diagnóstico e Epidemiologia Molecular	31
3.4 - Identificação Molecular do <i>M. tuberculosis</i> utilizando os Oligonucleotídeos Iniciadores INS1 e INS2	32
3.5 - Extração de DNA para a técnica <i>Spoligotyping</i>	34
3.6 - Tipagem molecular pela técnica do <i>Spoligotyping</i>	34
3.6.1 - Análise dos Resultados de <i>Spoligotyping</i>	36
3.7 - Técnica de MIRU	37
3.7.1 - Análise dos Resultados de MIRU	39
4. Resultados	41
4.1 - Diagnóstico Laboratorial	44

4.2 - Identificação Molecular dos isolados utilizando os Oligonucleotídeos Iniciadores INS1 e INS2	44
4.3 - Genotipagem pela técnica <i>Spoligotyping</i>	44
4.4 - Genotipagem pela técnica MIRU	58
4.5 - Associação das técnicas de <i>Spoligotyping</i> e de MIRU	62
5. Discussão	66
6. Conclusão	77
7. Referências Bibliográficas	79
8. Anexo	93

Lista de Tabelas

Tabela 1	Tabela 1: Número de identificação, sexo, data de entrada e perfil de Resistência dos Isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dos pacientes do Instituto Clemente Ferreira.	41
Tabela 2	Relação dos spoligotipos obtidos e a respectiva identificação de famílias, sub-famílias e spoligotipos dos 93 isolados de <i>M. tuberculosis</i> , de acordo com os bancos internacionais SpolDB4, SITVIT e Spotclust.	47
Tabela 3	Spoligotipos não descritos nos bancos internacionais SpolDB4, SITVIT e Spotclust identificados entre os isolados do Instituto Clemente Ferreira.	55
Tabela 4	Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> submetidos à técnica de MIRU.	58

Lista de Quadros

Quadro 1	Condição de amplificação dos isolados submetidos a PCR para identificação de <i>M. tuberculosis</i>	33
Quadro 2	Condição de amplificação dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> submetidos a PCR para realização da técnica <i>Spoligotyping</i> .	35
Quadro 3	Desenho das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores dos <i>loci</i> de MIRU estudados.	38
Quadro 4	Condição de amplificação dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> submetidos a PCR para realização da técnica de MIRU.	39
Quadro 5	Correlação entre os tamanhos em pb dos amplificados e os alelos de MIRU.	40
Quadro 6	Spoligotipos da família LAM descritos no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.	49
Quadro 7	Spoligotipos da família T descritos no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.	51
Quadro 8	Spoligotipos da família H descritos no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.	52
Quadro 9	Spoligotipos da família U descritas no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.	52
Quadro 10	Spoligotipos da família S descritas no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.	53
Quadro 11	Spoligotipos da família X descritas no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.	53

Quadro 12	Spoligotipos da família Beijing descritas no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.	54
Quadro 13	Principais <i>Shared International Spoligotypes</i> (SITs) encontrados em São Paulo.	54
Quadro 14	Similaridade entre os grupos clonais realizados pela técnica de <i>Spoligotyping</i> e os resultados obtidos pelo MIRU.	64

Lista de Figuras

- Figura 1 Fotografia do gel de agarose a 1% na confirmação molecular das cepas de *M. tuberculosis*, utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores INS1 e INS2 apresentando um fragmento de 245pb, um marcador de peso molecular de 100pb e o controle negativo (C-). 44
- Figura 2 Revelação da membrana de *Spoligotyping* apresentando os perfis genéticos das amostras, em seguida, o controle negativo (C-), o controle positivo da cepa padrão do *M. tuberculosis* (H37Rv) e do *M. bovis* (BCG). As linhas representam as amostras e as colunas os oligonucleotídeos espaçadores. 45
- Figura 3 Dendrograma produzido com os resultados obtidos pela técnica de *Spoligotyping*. 57
- Figura 4 Dendrograma produzido com os resultados obtidos pela técnica de MIRU. 61
- Figura 5 Dendrograma dos 93 isolados avaliados por *Spoligotyping* e MIRU. 63

Lista de Siglas e Abreviaturas

μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
μg	Micrôgrama
A	Adenina
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
C	Citosina
CAS	<i>Central and Middle Eastern Asia</i>
C.F.	Clemente Ferreira
dATP	Desoxiadenosina Trifosfato
dCTP	Desoxicitidina Trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina Trifosfato
dTTP	Desoxitimidina Trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DR	<i>Direct Repeat</i>
EAI	<i>East-African Indian</i>
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EST	Estreptomicina
EMB	Etambutol
F	Feminino
G	Guanina
H	Haarlem

Hab.	Habitantes
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INH	Isoniazida
IS	Sequência de inserção
LAM	<i>Latin-American-Mediterranean</i>
L.J.	Löwestein-Jensen
km ²	Quilômetros Quadrado
M	Masculino
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MDR	Multi Droga Resistente
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i>
	<i>M. tuberculosis Mycobacterium tuberculosis</i>
nmol	Nanomol
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
PZA	Pirazinamida
R	Resistente
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIF	Rifampicina
S	Sensível
SDS	<i>Sodium Dodecyl sulfate</i>

Spoligotyping Spacer Oligonucleotide Typing

SIT	<i>Shared International Spoligotypes</i>
ST	<i>Shared-types</i>
T	Timina
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
x	Vezez

Resumo

O estudo da epidemiologia molecular através de diferentes técnicas vigentes revolucionou a compreensão da epidemiologia da tuberculose. A técnica *Spoligotyping* tem sido extensamente aplicada no estudo da epidemiologia molecular da tuberculose, para abordar estrutura populacional do *M. tuberculosis*, atentando para identificar principais linhagens e distribuições geográficas. Por outro lado, técnicas moleculares para diferenciar cepas de *M. tuberculosis*, tais como RFLP e MIRU possibilitam agrupar isolados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes que apresentam ligações epidemiológicas, identificando cadeias de transmissão e discriminando os isolados a nível clonal. A presente dissertação objetivou utilizar as técnicas de *Spoligotyping* e MIRU, para compreender um pouco mais sobre a tuberculose de uma metrópole, avaliando isolados provenientes do Ambulatório do Instituto Clemente Ferreira (referência no tratamento de tuberculose) na cidade de São Paulo. Os isolados clínicos de pacientes atendidos no período de agosto de 2006 a julho de 2008 foram re-identificados pela técnica molecular de PCR, e as cepas identificadas como de *M. tuberculosis* foram submetidas à genotipagem pelas técnicas de *Spoligotyping* e MIRU. Foi confirmada a identificação de *M. tuberculosis* em 93 isolados clínicos pela técnica de PCR-IS6110. No *Spoligotyping*, do total de 93 isolados, 21 amostras (22,6%) revelaram spoligotipos ainda não descritos na base de dado mundial (SpolDB4, SITVIT e Spotclust) e 51 (54,8%) estavam envolvidos em 12 *cluster*, 7 diferentes famílias e 36 spoligotipos. A família mais freqüente foi a LAM (26 isolados), seguida de T (24 isolados) e Haarlem (11 isolados), que juntos representaram 65,4% de todos os isolados. Essas 3 famílias representam os genótipos mais freqüentemente encontrados na África, América Central, América do Sul e Europa. Seis SITs acomodaram 51,4% (37/72) de todos os isolados identificados no SpolDB4 (SIT53, SIT50, SIT42, SIT60, SIT17 e SIT1). Pela técnica de MIRUs, os *loci* 10, 23, 26 e 40, foram os mais discriminatórios. Nenhum grupo genético com 100% de similaridade foi encontrado entre os 93 isolados através dessa técnica. Entretanto quando associado com a técnica *Spoligotyping* os isolados agrupados em 12 *cluster*, foram separados e apresentaram similaridade de até 91%. A diversidade dos genótipos encontrados na cidade de São Paulo é devido à grande variedade de etnias encontradas nessa megalópole.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Epidemiologia Molecular; Tuberculose; *Spoligotyping* e MIRU. Suporte Financeiro: CNPq – Universal 472867/2006-7

Abstract

The molecular epidemiology study using different techniques has improved the epidemiology of tuberculosis understanding. The Spoligotyping technique has been widely applied in the study of molecular epidemiology of tuberculosis, to address population structure of *M. tuberculosis*, focusing on the identification of the main lines and geographic distributions. Furthermore, molecular techniques used to differentiate strains of *M. tuberculosis*, such as RFLP and MIRU can be used for clustering clinical isolates of *M. tuberculosis* from patients with epidemiological links, identifying chains of transmission and discriminating isolates at the clonal level. In this work the techniques of Spoligotyping and MIRU were used to understand a little more about tuberculosis in a metropolis, assessing isolates from the Ambulatory Clemente Ferreira Institute (reference in the treatment of tuberculosis) in São Paulo. Clinical isolates from patients treated between August 2006 and July 2008 were re-identified by the molecular technique of PCR, were strains identified as *M. tuberculosis* were evaluated through genotyping the use of Spoligotyping and MIRU techniques. By PCR-IS6110 the identification of *M. tuberculosis* was confirmed in 93 clinical isolates. The total of 93 isolates, 21 samples (22.6%) in Spoligotyping showed spoligotypes have not yet been described in the world's data base (SpolDB4, SITVIT and Spotclust) and 51 (54.8%) were involved in 12 clusters, seven different families and 36 spoligotypes. The most frequent family was the LAM (26 isolates), followed by T (25 isolates) and Haarlem (11 isolates), which together accounted 65,4% of all isolates. These three families represent the most frequently genotypes found in Africa, Central America, South America and Europe. Six SITs accommodated 51.4% (37/72) of all isolates identified in SpolDB4 (SIT53, SIT50, SIT42, SIT60, SIT17 and SIT1). By technique of MIRU loci 26, 40, 23 and 10, were the most discriminatories. In the genetic group with 100% similarity 93 isolates using this technique were found. However when combined with Spoligotyping technique isolates grouped in 12 clusters, were separated and showed similarity of 91%. The diversity of genotypes found in São Paulo is due to the wide variety of ethnic groups found in this megalopolis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Molecular Epidemiology; Tuberculosis; Spoligotyping; MIRU. Financial support : CNPq – Universal 472867/2006-7

1. Introdução

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único representante da família *Mycobacteriaceae*. Apresentam-se como bacilos curvos ou retos 0,2-0,7 µm de largura por 1-10 µm de comprimento e possuem propriedade de álcool-ácido resistência, devido à grande quantidade de lipídeos presentes em sua parede celular, caracterizados pela presença de ácidos graxos constituídos de ácidos micólicos de cadeia longa. São aeróbias, não esporuladas e classificadas de acordo com o seu tempo de crescimento, sendo consideradas de crescimento rápido quando requerem menos de 7 dias para produzir colônias visíveis e de crescimento lento, aquelas que requerem mais de 7 dias para produzir colônias visíveis quando inoculadas em meios de cultura sólidos (LEITE & SATO, 2006).

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* é constituído pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* e *M. tuberculosis* (bacilo de Koch) é a espécie mais importante em termos clínicos e foi a primeira a ser descrita em 1886. É o agente etiológico da tuberculose pulmonar, que no adulto se caracteriza por uma inflamação crônica intensa, necrose e caseificação do tecido pulmonar (LEITE & SATO, 2006).

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa caracterizada por elevada morbimortalidade em países subdesenvolvidos e em zonas urbanas de países desenvolvidos. Uma estimativa de 9,3 milhões de novos casos de tuberculose em 2007 no mundo salienta que *Mycobacterium tuberculosis* é ainda um importante problema de saúde pública e uma grande preocupação epidemiológica. A incidência na América latina é de 46/100.000 habitantes (SEQUERA *et al.*, 2008), entretanto no Brasil, em 2008 foi verificado 70.989 novos casos de tuberculose com uma incidência de 37/100.000 habitantes e 4.735 óbitos (WHO – *World Health Organization*, 2010). Apesar do Brasil

ocupar a 19ª posição entre os 22 países com maior número de casos de tuberculose no mundo, a partir de 2007, houve uma diminuição de 26% na incidência e uma diminuição de 32% na mortalidade em nosso país. Esta diminuição aconteceu desde a implementação da estratégia DOTS em 1999 (CONDE *et al.*, 2009). Entre as regiões brasileiras, a sudeste detém cerca de 40% dos casos, sendo que na cidade de São Paulo (SP) são encontrados aproximadamente metade dos pacientes (MALASPINA *et al.*, 2008).

A tuberculose é conhecida há mais de 6.000 anos, mas o seu controle e erradicação tornaram-se possível após a introdução de quimioterapia multi-droga, no século 20 (KLAUTAU & KUSCHNAROFF, 2005). No entanto, o número de casos de tuberculose tem aumentado mundialmente nas últimas duas décadas. Isso ocorreu em parte devido a pandemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV), ocorrendo uma coinfeção do *M. tuberculosis* com o HIV mudando significativamente o equilíbrio natural entre o homem e o bacilo de Koch (KLAUTAU & KUSCHNAROFF, 2005). Estima-se que haja 42 milhões de pessoas com infecção pelo HIV em todo o mundo e um quarto destas estão co-infectadas com *M. tuberculosis*. Isso significa que existem 11 milhões de adultos co-infectados e cerca de 200.000 pessoas com HIV morreram de HIV associado com tuberculose no mundo (WHO – *World Health Organization*, 2010). Na África Sub-Sahariana encontra-se uma epidemia de HIV co-infectados com tuberculose (KLAUTAU & KUSCHNAROFF, 2005).

A tuberculose é transmitida de pessoa a pessoa por via aérea, através de gotículas de 1 a 5 µm de diâmetro produzidas pelo indivíduo portador da forma clínica pulmonar ou laríngea da doença, ao tossir, espirrar ou falar (EDWARDS & KIRKPATRICK, 1986). O bacilo ao alcançar os alvéolos pulmonares estabelece a tuberculose infecção que pode evoluir para a tuberculose doença em cerca de 5 a 10%

dos casos. Entretanto na grande maioria o bacilo pode permanecer viável, na forma latente no interior de granulomas (EDWARDS & KIRKPATRICK, 1986). Neste sentido, mais comumente a tuberculose doença ocorre devido à reativação da infecção latente dos bacilos (*Mycobacterium tuberculosis*) adquirida na infância (EDWARDS & KIRKPATRICK, 1986).

Devido à transmissão aérea, a tuberculose pulmonar é a forma mais comum dentre as formas clínicas existentes e os achados radiológicos são típicos, com lesões cavitárias na parte superior do lóbulo pulmonar. Formas extrapulmonares são mais freqüentes em pacientes imunodebilitados (KLAUTAU & KUSCHNAROFF, 2005).

A partir de 1940 começaram a surgir os antimicrobianos que trariam finalmente a cura da tuberculose nos anos seguintes. Na década de 60, foi instituído o esquema definitivo de três antibióticos administrados simultaneamente, promovendo a cura de 95% dos pacientes. O tratamento adotado no Brasil era composto pelos os antibióticos rifampicina (RIF), isoniazida (INH) e pirazinamida (PZA) com seis meses de duração, sendo os dois primeiros meses com RIF, INH e PZA e os quatro subseqüentes com RIF e INH. Este esquema de tratamento mais curto é eficaz e menos tóxico, apesar de 20 vezes mais caro do que o previamente adotado com duração de 12 meses. Entretanto, seu uso associado a uma política racional de redução de tempo hospitalar, trouxe economia significativa de recursos, possibilitando sua implementação em todo o país, de forma pioneira em todo o mundo (BRASIL, 2002; KRITSKI *et al.*, 2000). Com o aumento no número de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas (MDR), atualmente foi acrescentado uma quarta droga nos dois primeiros meses, o Etambutol (EMB). Nos quatros últimos meses foi mantido com RIF e INH. Esse esquema básico é indicado para todos os casos novos de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar (com exceção de meningoencefalite), bem como para todos os casos de

reincidência e de retratamento por abandono (CONDE *et al.*, 2009). O esquema de tratamento, no caso de falência do esquema básico, é composto por cinco medicamentos na primeira fase (estreptomicina, etambutol, ofloxacina, pirazinamida e terizidona) durante seis meses e três medicamentos (etambutol, ofloxacina e terizidona) durante 12 meses na fase de manutenção, totalizando uma duração de 18 meses (CONDE *et al.* 2009).

Segundo Farnia *et al.* (2008), vem crescendo o número de relatos de transmissão de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas que são simultaneamente resistentes a INH e RIF. A MDR representa uma ameaça que deve ser cuidadosamente avaliada, pois o prolongamento da fase de transmissão possibilita que estas cepas resistentes se tornem predominantes em uma comunidade (FARNIA *et al.*, 2008).

A possibilidade da aplicação de técnicas de biologia molecular para detecção e identificação rápida do *M. tuberculosis* é crucial para a prevenção e o controle da tuberculose. O par de oligonucleotídeo iniciador universalmente aceito é o que amplifica fragmento da seqüência de inserção IS6110, específico do Complexo *M. tuberculosis* (KLATSER *et al.*, 1998). A amplificação de um fragmento de DNA contido na seqüência de inserção IS6110 tem sido o método de escolha na identificação molecular pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*) do complexo *M. tuberculosis* (van EMBDEN *et al.*, 1993). O IS6110 é um transposon que se repete de uma a 20 vezes dentro do genoma micobacteriano conferindo alta sensibilidade ao método (HIRATA *et al.*, 1997).

A tuberculose é um exemplo de doença infecciosa em que as técnicas de biologia molecular permitiram a obtenção de informações que seriam difíceis, ou até mesmo impossíveis de serem obtidas através de métodos laboratoriais convencionais (SUPPLY *et al.*, 2000, 2001). A epidemiologia molecular revolucionou a compreensão

da epidemiologia da tuberculose permitindo comparação entre linhagens de *M. tuberculosis* de diferentes áreas geográficas, o rastreamento da movimentação de linhagens individuais, confirmação de surtos em instituições e identificação de fatores de risco em infecções por *M. tuberculosis* em comunidade (FOXMAN & RILEY, 2001). A possibilidade da aplicação de técnicas de biologia molecular em estudos epidemiológicos, concomitante com a epidemiologia clássica, tem trazido enormes contribuições para melhor entender as relações entre os micro-organismos e as doenças infecciosas. O estudo da epidemiologia molecular para *M. tuberculosis*, é realizado através de diferentes técnicas vigentes como *IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Spacer Oligonucleotide Typing* (*Spoligotyping*) e *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU) (MORCILLO *et al.*, 2007, FARNIA *et al.*, 2008).

Técnicas moleculares para diferenciar cepas de *M. tuberculosis*, tais como RFLP e MIRU possibilitam agrupar isolados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes que apresentam ligações epidemiológicas, identificando cadeias de transmissão e discriminando os isolados em nível clonal (COWAN *et al.*, 2005). Para tal, os marcadores genéticos destas metodologias devem ser polimórficos suficientes para distinguir isolados não relacionados e estáveis para agrupar isolados que formam a mesma cepa. A técnica de RFLP-*IS6110* é reconhecida como padrão ouro para diferenciar cepas de *M. tuberculosis*, que aliados aos dados dos pacientes permite que se estabeleça uma correlação epidemiológica. A inserção irregular de *IS6110* no genoma das micobactérias permite a discriminação de cepas através da técnica de RFLP. Com base em observações laboratoriais e em pacientes durante surtos, o *IS6110*-RFLP, apesar de altamente diverso, geralmente permanece estável o suficiente para ser usado como um marcador para comprovar ligações epidemiológicas (van SOOLINGEN *et al.*, 1991). As cepas são tipadas de acordo com o padrão eletroforético de bandas, gerado

por diferenças na localização da sequência *IS6110* no cromossomo e no número de cópias deste elemento, sendo esta técnica amplamente utilizada e recomendada, pois pode ser realizada de forma reprodutiva e padronizada (KREMER *et al.*, 1999). Para Tenover *et al.* (1997), amostras com pequenas alterações no número ou na altura de bandas, devido a uma simples mutação, inserção, deleção ou inversão, podem ser identificadas como cepas relacionadas e pertencentes a um mesmo agrupamento ou família. Apesar de seu excelente poder discriminatório, a técnica de *IS6110*-RFLP, quando aplicada em cepas com baixo número de cópias da *IS6110*, tem sua capacidade de discriminação diminuída, havendo a necessidade da utilização de métodos de genotipagem complementares (PARK *et al.*, 2000; SAHADEVAN *et al.*, 1995). Entretanto, apesar dos resultados promissores, a técnica de RFLP é trabalhosa, necessitando de pessoal altamente qualificado para a realização do ensaio e requer grande quantidade de DNA, sendo tendência mundial a substituição desta técnica por outras de execução mais rápida e facilitada. Dentre elas, vêm sendo sugeridas técnicas de epidemiologia molecular muito bem aceitas como a de MIRU (COWAN *et al.*, 2005).

A técnica de MIRU é uma técnica baseada na PCR que foi desenvolvida por SUPPLY *et al.* (2000) e se baseia no estudo de VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), que são seqüências que se repetem (*Tandem Repeats*) até centenas de vezes (PANDOLFI *et al.*, 2007). A técnica de MIRU consiste em um sistema altamente reprodutível e rápido, e nesta técnica, há geração de genótipos confiáveis baseado no estudo detalhado de 12 *loci* semelhantes à mini-satélites, contendo VNTRs do genoma do complexo *M. tuberculosis* (SUPPLY *et al.*, 2001). Esta técnica possibilita uma comparação entre linhagens de forma semelhante à técnica de RFLP, porém de execução muito mais fácil, o que permite a identificação de mais focos de contágio na

população, podendo-se assim estudar métodos mais adequados para interromper a transmissão da doença (SUPPLY *et al.*, 2001). Baseado na estabilidade dos 12 *loci* de MIRU, a descoberta de variações no genótipo de MIRU-VNTR pode auxiliar na definição de re-infecção exógena, que é normalmente baseada na observação da variação de no mínimo 3 a 4 bandas de RFLP-IS6110. Esse recurso é particularmente importante para estimar os níveis de sucesso dos programas de controle de tuberculose e avaliação de novos métodos clínicos e novas terapias (SAVINE *et al.*, 2002).

Por outro lado, a técnica *Spoligotyping* que também tem sido extensamente aplicada no estudo da epidemiologia molecular da tuberculose, é utilizada para abordar estrutura populacional do *M. tuberculosis*, atentando para identificar principais linhagens e distribuições geográficas (PANDOLFI *et al.*, 2007). Esse método baseia-se no polimorfismo do DNA dentro do *locus* de repetição direta (*direct repeat* - DR *locus*) do *M. tuberculosis*, determinando a presença ou ausência dos espaçadores específicos entre as seqüências DR. O *locus* apresenta alto polimorfismo, revelando extensa variabilidade genética em *M. tuberculosis*. A variação dos espaçadores dentro das regiões DRs é utilizada para diferenciar as cepas de *M. tuberculosis* por PCR, gerando spoligotipos (GROENEN *et al.*, 1993). Os spoligotipos comuns a mais de um isolado são designados como *Shared Types* (ST) e atribuídos um número “*Shared International Type*” (SIT), de acordo com o banco de dados internacional SpolDB4 (SOLA *et al.*, 2001). Os SITs são então agrupados em famílias e sufamílias. A técnica de *Spoligotyping* é prática e soma-se a vantagem de encontrar bases de dados do mundo todo. A organização de uma base de dados internacional de spoligotipos tornou possível uma visão global da distribuição geográfica dos genótipos (SOLA *et al.*, 2001) determinando a origem geográfica das cepas (DAVID *et al.*, 2004). Este Banco Internacional de *Spoligotyping* SpolDB4 (BRUDEY *et al.*, 2006) contém 1.939 perfis

compartilhados (SITs) representando um total de 39.295 isolados clínicos originários de 122 países. Este banco fornece um retrato mundial da diversidade genética do Complexo *M. tuberculosis* através do *Spoligotyping*. Seu livre acesso e a facilidade da apresentação dos dados permitem a ampla utilização das informações para o estabelecimento de análises e comparações genéticas e epidemiológicas. O elevado número de genotipagem pela técnica de *Spoligotyping* tem permitido a distinção entre famílias de distribuição global como Beijing, daquelas que tem especificidade regional. A família clonal Beijing é de ampla distribuição sendo caracterizada pela resistência a múltiplas drogas quando comparada as outras famílias do complexo *M. tuberculosis* (van SOOLINGEN *et al.*, 1995; GLYNN *et al.*, 2002). O *Spoligotyping* é atualmente o método padrão-ouro para identificação e classificação de cepas Beijing (SUN *et al.*, 2008). A família indiana ancestral Leste-Africano (EAI) é composta por pelo menos cinco principais subfamílias e a família Haarlem (H) é constituída de três grandes subfamílias. Isolados de *M. tuberculosis* da Ásia Central e do Oriente Médio foram agrupadas em duas famílias recém-definidas (CAS1 e CAS2). A família X é atualmente dividida em pelo menos três subfamílias bem definidas. As subfamílias da família T (T1-T4, likely) difere do perfil compartilhado clássico *shared-type* (ST 53) que apresenta todos os espaçadores com exceção daqueles de 33 a 36, continua a ser mal definida. A família Latino-americana e Mediterrânea (LAM) é dividida em subfamílias de LAM1 a LAM10 (FILLIOL *et al.*, 2002). Desta forma, a técnica de *Spoligotyping* consiste em uma ferramenta poderosa para estudar epidemiologia, filogenia e adaptabilidade dos bacilos da tuberculose de acordo com o seu genótipo (KANDUMA *et al.*, 2003).

Kwara *et al.* (2003) avaliaram a utilidade epidemiológica dos métodos de MIRU e *Spoligotyping*, concluindo que a primeira técnica produz resultados melhores do que a

segunda. Cowan *et al.* (2002) compararam as técnicas de MIRU, RFLP e *Spoligotyping* em um grupo de 180 amostras de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, com baixo número de cópias de IS6110, observaram que a técnica de MIRU possibilitou a distinção de 80 padrões, contra 58 de RFLP e 59 de *Spoligotyping*. Quando estes resultados foram cruzados, 122 padrões foram obtidos, indicando que é necessário o emprego de vários métodos para se atingir maior especificidade. Com isso, a técnica de MIRU aplicada como primeira tipagem molecular junto com a técnica de *Spoligotyping*, tem apresentado uma boa discriminação na maioria dos casos, incluindo estudos em larga escala (ALLIX-BÉGUEC *et al.*, 2008).

Há cerca de 4 anos o nosso laboratório de micobactérias Prof. Dr. Hugo David, vem trabalhando em colaboração com o Instituto Clemente Ferreira de São Paulo no quesito ao diagnóstico molecular da tuberculose. Para tal, temos implantada a técnica da PCR. Por outro lado, recentemente, a técnica de MIRU (PANDOLFI *et al.*, 2006) e *Spoligotyping* (MALASPINA *et al.*, 2008) foram introduzidas, no nosso laboratório, para o estudo da epidemiologia molecular da tuberculose. O Instituto Clemente Ferreira foi fundado em 1913, é a Instituição pioneira no combate à tuberculose. Atualmente é um Centro de Referência para todo o Estado de São Paulo na abordagem da tuberculose e outras doenças pulmonares, sendo referência nacional no combate a doença. É responsável pelo atendimento, tratamento e acompanhamento dos doentes na cidade de São Paulo, sendo especializado em atender pacientes com dificuldades no tratamento.

Neste sentido, para entendermos mais sobre a epidemiologia da tuberculose pulmonar, este trabalho teve como objetivo o estudo da diversidade genética de isolados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes do município de São Paulo – SP atendidos pelo Instituto Clemente Ferreira, no período de agosto de 2006 à junho de 2008.

Este estudo é de grande interesse na Saúde Pública, pois traz como consequências práticas e imediatas: 1- A identificação de *M. tuberculosis* e se necessário de outras micobactérias isoladas de pacientes da cidade de São Paulo 2- Possibilidade de agrupar por similaridade genética as cepas de *M. tuberculosis* isoladas destes pacientes, avaliando assim presença ou ausência de cepas predominantes, 3- Avaliar a presença de grupos genéticos entre *M. tuberculosis* MDR, 4- Possibilidade de comparação os resultados obtidos em outros estudos.

2.Objetivos

2.1 – Geral

O objetivo do presente projeto é o estudo da diversidade genética de isolados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes do município de São Paulo – SP atendidos pelo Instituto Clemente Ferreira, no período de agosto de 2006 à junho de 2008.

2.2 – Específicos

- Confirmar a identificação dos isolados de *M. tuberculosis* através da técnica de PCR;
- Realizar a genotipagem dos isolados de *M. tuberculosis* pelas técnicas de *Spoligotyping* e de MIRU;
- Agrupar por similaridade genética os isolados de *M. tuberculosis* estudados;
- Avaliar comparativamente os grupos genéticos formados pela técnica do MIRU e de *Spoligotyping*;
- Avaliar a presença efetiva de grupos genéticos de *M. tuberculosis* predominantes na cidade de São Paulo.

3. Material e métodos

3.1 - Isolados clínicos:

Foram incluídos no estudo isolados clínicos sugestivos de *M. tuberculosis* provenientes de 105 pacientes de ambos os sexos com idade entre 18 e 65 anos matriculados no Instituto Clemente Ferreira com diagnóstico de tuberculose pulmonar atendidos no período entre agosto de 2006 à julho de 2008.

O diagnóstico da tuberculose pulmonar foi suspeitado pelo histórico clínico do paciente, confirmado pelo médico e encaminhado o material (escarro) para o diagnóstico laboratorial.

3.2 - Diagnóstico Laboratorial

A identificação do *M. tuberculosis* foi realizada pela baciloscopia, do isolamento do micro-organismo em Löwestein-Jensen (L.J) e sua identificação pela metodologia clássica (LEITE & SATO, 2006). As cepas foram congeladas em água e estocadas em freezer à -20°C. Esta primeira parte do trabalho foi realizada no Instituto Clemente Ferreira.

3.3 - Diagnóstico e Epidemiologia Molecular

Todo o procedimento de manipulação de células de *M. tuberculosis* viáveis foi realizado no Laboratório de Micobacteriologia Prof. Dr. Hugo David (de Segurança Nível 3) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP.

Os isolados clínicos congelados, identificados como de *M. tuberculosis* foram descongelados, reativados e re-identificados pela técnica molecular de PCR. A

genotipagem dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* foi realizada através dos métodos de *Spoligotyping* e MIRU.

A reativação e verificação da pureza da suspensão bacteriana foram feitas segundo Malaspina, (2004). Após o descongelamento à temperatura ambiente, 200µL de cada amostra bacteriana foram colocado em 2,0mL do meio de cultura 7 H9 enriquecido com 10% de OADC (BD BBL®) e acrescido de 20µL do antifúngico Ciclohexemida a 5% e incubado a 37°C por 7 dias, com agitação manual uma vez ao dia. Em presença de turvação, o material foi submetido à bacterioscopia utilizando uma alíquota de 100µL que foi depositada em uma lâmina para confecção de esfregaço, fixada pelo calor e corado pela técnica de Ziehl- Neelsen para verificação da pureza da cultura de Bacilos Álcool-Ácido-Resistentes (BAAR). Em caso positivo, o conteúdo de 200µL de cada tubo, com cultura supostamente reativada, era transferido para dois tubos contendo meio de L.J. inclinado e incubado por no mínimo 21 dias a 37°C podendo chegar a 60 dias.

3.4 - Identificação Molecular do *M. tuberculosis* utilizando os Oligonucleotídeos Iniciadores INS1 e INS2

Após a multiplicação bacteriana no meio de L.J., as culturas positivas foram submetidas à extração de DNA por termólise segundo Mazars *et al.* (2001), com pequenas modificações. O procedimento constituiu em submeter, uma alçada da colônia crescida em meio sólido acrescido em 300µL de tampão TE pH 8,0 (Tris-Hcl + EDTA) em um microtubo com tampa de trava, a três ciclos de fervura por 10 minutos seguido de 30 minutos de congelamento a -20°C.

O DNA extraído foi submetido à PCR que amplificou especificamente o fragmento de 245 pb contidos na sequência de inserção IS6110, empregando os

oligonucleotídeos iniciadores INS1 (5' CGTGAGGGCATCGAGGTGGC 3') e INS2 (5' GCGTAGGCGTCGGTGACA AA 3') (van EMBDEN *et al.*, 1993).

Para a amplificação, foi utilizado um volume final de 25µL, onde em tubos de 0,2mL foram acrescentados 21,5µL da mistura pronta Master Mix na diluição de 2 partes de água para 1 de parte de Master Mix (Fermentas) (que é composto por: 0.05 unidades/µL Taq DNA Polimerase, 4mM MgCl₂, 0.4mM dATP, 0.4mM dCTP, 0.4 mM dGTP e 0.4mM dTTP), 0,5µL dos oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 25pmol INS1 e INS2 e 2,5µL do DNA de cada amostra, extraído por termólise.

A mistura da reação foi amplificada em Termociclador (PTC-100, MJ Research) empregando o seguinte protocolo de ciclagem:

Quadro 1. Condição de amplificação dos isolados submetidos a PCR para identificação de *M. tuberculosis*

PASSO	TEMPO	TEMPERATURA	QUANTIDADE DE CICLOS
1º	10 minutos	95°C	1
2º	1 minuto	94°C	30
	2 minutos	56°C	
	1 minuto	72°C	
3º	7 minutos	72°C	1
4º	∞	4°C	1

Na sequência, 15µL do produto amplificado foi aplicado em gel de agarose a 1% contendo Brometo de etídio na concentração de 10µg/mL e o produto da amplificação foi resolvido por eletroforese a 90 volts e o padrão de peso molecular de 100pb na concentração recomendada pelo fabricante (Fermentas) foi adicionado. A leitura da eletroforese foi feita com o auxílio de um transiluminador ultravioleta e fotodocumentada empregando Alpha Imager – Alpha Innotech® (van EMBDEN *et al.*, 1993).

3.5 - Extração de DNA para a técnica *Spoligotyping*

Um raspado da amostra bacteriana foi adicionado a 300µL de tampão de lise, agitado em *vórtex* e congelado a -20° C por 30 minutos. O material foi aquecido por 10 minutos em água fervente e repetiu-se o congelamento seguido de fervura. Ao tubo foram adicionados 600µL da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), após agitação foi realizada centrifugação e a fase aquosa foi separada em um novo tubo com 600µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Duas centrifugações seguidas da adição de clorofórmio/álcool isoamílico separaram novamente a fase aquosa. O DNA presente na amostra foi precipitado com 300µL de etanol absoluto e lavado duas vezes com etanol 70% previamente refrigerado. O sobrenadante foi desprezado, os sedimentos foram secos e ressuspensos em 30µL de tampão TE, e após refrigeração por 2 horas, o material foi armazenado a -20° C.

3.6 - Tipagem molecular pela técnica do *Spoligotyping*

A técnica de *Spoligotyping* foi realizada segundo Kamerbeek *et al.* (1997). O DNA bacteriano extraído, foi submetido à PCR para amplificação das regiões DRs utilizando os oligonucleotídeos iniciadores DRa (5' GGTTTGGGTCTGACGAC 3') e DRb (5' CCGAGAGGGGACGGAAAC 3'). Para a diluição de estoque dos oligonucleotídeos iniciadores, foi adicionado ao liofilizado 22µL de água estéril, obtendo uma concentração de 0,5nmol. Os *primers* foram alíquotados em sua diluição de uso (1µL da solução estoque em 99µL de água estéril), obtendo uma concentração final de 5µM.

Para a amplificação, foi utilizado um volume final de 25µL, onde em tubos de 0,2mL foram acrescentados 20,0µL de Master Mix na diluição de 1 parte de água para 1

de parte de Master Mix (Fermentas), 2,0 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador (Dra e Drb) [11 nmol] e 1,0 μ L do DNA extraído de cada amostra. A mistura da reação foi amplificada em Termociclador (PTC-100, MJ Research), segundo o quadro 2 (KAMERBEEK *et al.*,1997). Posteriormente os produtos de PCR foram checados em gel de agarose a 1%, para verificar a amplificação da sequência esperada.

Quadro 2: Condição de amplificação dos isolados de *M. tuberculosis* submetidos a PCR para realização da técnica *Spoligotyping*.

PASSO	TEMPO	TEMPERATURA	QUANTIDADE DE CICLOS
1º	15 minutos	95°C	1
2º	60 segundos	95°C	20
	60 segundos	55°C	
	30 segundos	72°C	
3º	5 minutos	72°C	1
4º	∞	4°C	-

Após a amplificação do DNA, em tubos de 0,2mL foi adicionado 20 μ L dos produtos da PCR para 150 μ L SSPE 2x/SDS 0,1%. Essa mistura foi aquecida (desnaturação da fita de DNA) no termociclador durante 10 minutos a 99°C e colocada imediatamente no gelo.

Enquanto isso a membrana previamente lavada por 5 minutos a 60°C em 250mL de SSPE 2x/SDS 0,1% foi colocada no suporte *cushion* no *minibloter*, de tal forma que os *slots* ficaram perpendiculares a linha padrão dos oligonucleotídeos presentes na membrana. Foi retirado o líquido residual das faixas do *miniblotter* por aspiração e os espaços foram preenchidos com o produto da PCR diluída. Nessa etapa é importante evitar a formação de bolhas de ar. A hibridização ocorreu por 60 minutos a 60°C em um forno, sobre uma superfície horizontal.

As amostras presentes nos *slots* foram retiradas do *miniblotter* por aspiração, em seguida, a membrana foi lavada por duas vezes em 250mL SSPE 2x/SDS 0,5% durante 10 minutos a 60°C e colocada na garrafa de hibridização. Nessa etapa a membrana deve estar fria para evitar inativação da peroxidase na próxima etapa.

Foi adicionado 2,5μL do conjugado de estreptavidina-peroxidase (500U/mL) para 10 mL de SSPE 2x/SDS 0,5% e a membrana foi incubada por 45 a 60 minutos a 42°C na garrafa de hibridização. Posteriormente a membrana foi lavada por duas vezes em 250mL de SSPE2x/SDS 0,5% por 10 minutos a 42°C e em seguida duas vezes com 250mL de SSPE 2x durante 5 minutos em temperatura ambiente.

Para detecção da hibridização do DNA por quimioluminescência, a membrana foi incubada por 1 minuto, em 20mL do revelado líquido ECL (10mL do reagente 1 e 10mL do reagente 2) na concentração recomendada pelo fabricante (GE Healthcare), coberta com um plástico transparente e colocada no casset de Raio-X.

Em uma sala na ausência de luz foi colocado o filme sobre a membrana e deixado por 20 minutos. A detecção dos sinais da hibridação foi observada pela autoradiografia.

3.6.1 - Análise dos Resultados de *Spoligotyping*

A membrana foi analisada de 3 em 3 espaçadores, onde para cada espaçador um valor é atribuído, 4, 2 e 1 respectivamente. Em presença dos espaçadores, os valores foram somados, por exemplo, se o isolado apresentar os 3 espaçadores o valor será 7, se o isolado não apresentar o segundo espaçador o valor será 5, e a interpretação é realizada até obter o número de 15 dígitos para cada isolado. Spoligotipos comuns a mais de um isolado foi designado de *Shared Type* (ST) e atribuídos a eles, um número “*Shared International Type*” (SIT) de acordo com a base de dados internacional

SpolDB4 e comparado com SITVIT, que é uma versão atualizada do banco de dados SpolDB4 (BRUDEY *et al.* 2006), disponível em <http://www.pasteur.guadelupe.fr.8081/SITVITdemo/index.jsp>. Com auxílio do SpolDB4 e SITVIT, os spoligotipos foram agrupados em famílias e subfamílias. Para spoligotipos não relatados no SpolDB4 e SITVIT, o banco de dados Spotclust foi utilizado (VITOL *et al.* 2006), que tem como base o banco de dados SpolDB3, disponível em <http://cgi2.cs.rpi.edu/~bennek/SPOTCLUST.html>. O Spotclust permite verificar a porcentagem de similaridade do ST com as sub-famílias já descritas.

Determinado o perfil, cada família foi analisada comparativamente empregando o programa Bionumerics, Euclidiana (Applied Maths[®]) e construído um dendrograma de acordo com a similaridade genética.

3.7 - Técnica de MIRU

Para a técnica de MIRU foram empregados os mesmos DNAs extraído por termólise, utilizados na Identificação Molecular do *M. tuberculosis* utilizando os 12 Oligonucleotídeos Iniciadores INS1 e INS2.

A amplificação dos alelos foi feita segundo Supply *et al.* (2000) modificado por Pandolfi (2006), onde são utilizados 12 pares de oligonucleotídeos iniciadores, para amplificar regiões repetitivas não codificadoras, realizando para cada cepa um total de 12 reações com temperaturas de anelamento diferentes em 3 delas como está descrito no quadro 3, segundo Mazars *et al.* (2001).

Quadro 3. Desenho das seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores dos 12 *loci* de MIRU estudados.

Locus de MIRU	Identificação	Seqüência do oligonucleotídeo	Temperatura de hibridização
02	2F	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT	60°C
	2R	TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT	
04	4F	GCGCGAGAGCCCGAACTGC	55°C
	4R	GCGCAGCAGAAACGTCAGC	
10	10F	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	55°C
	10R	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	
16	16F	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA	55°C
	16R	CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC	
20	20F	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG	55°C
	20R	GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA	
23	23F	CTGTTCGATGGCCGCAACAAAACG	55°C
	23R	AGCTCAACGGGTTTCGCCCTTTTGTC	
24	24F	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT	50°C
	24R	GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA	
26	26R	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	50°C
	26F	CATAGGCGACCAGGCGAATAG	
27	27F	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA	55°C
	27R	GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA	
31	31F	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	55°C
	31R	GTGCCGACGTGGTCTTGAT	
39	39F	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC	55°C
	39R	CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT	
40	40F	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT	55°C
	40R	GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	

Empregando volume final de 25µL em cada reação, foram utilizados 21µL da mistura pronta Master Mix (Fermentas) na diluição de 1 parte de Master Mix para 2 partes de água ultra-pura acrescido de 1µL dos oligonucleotídeos iniciadores R e F [25pmol] correspondentes aos *loci* estudado e 2µL do DNA extraído por termólise. Para a amplificação foram utilizados os ciclos descritos no quadro 4.

Quadro 4. Condição de amplificação dos isolados de *M. tuberculosis* submetidos a PCR para realização da técnica de MIRU.

PASSO	TEMPO	TEMPERATURA	QUANTIDADE DE CICLOS
1º	15 minutos	95°C	1
2º	1 minuto	94°C	40
	1 minuto	60°C, 55°C, 50°C	
	2 minutos	72°C	
3º	10 minutos	72°C	1
4º	∞	4°C	-

Os produtos de amplificação, de tamanho variável, foram resolvidos junto com os padrões de peso molecular (50pb e 100pb) por eletroforese em gel de agarose a 2% contendo Brometo de Etídio (10µg/mL). A eletroforese foi fotodocumentada e as imagens dos géis foram digitalizadas para análise e confecção de dendrograma.

3.7.1 - Análise dos Resultados de MIRU

Os amplificadores de MIRU foram classificados em alelos para cada um dos 12 *loci* estudados. Após obtenção dos amplificadores de todas as amostras para um dado *locus*, foram determinados os tamanhos dos fragmentos em pares de base. O seu tamanho foi determinado com o auxílio dos padrões moleculares de 50pb e 100pb e comparado com a tabela de alelos descrito no quadro 5 (MAZARS *et al.*, 2001), que mostra o valor do alelo correspondente ao tamanho da banda observada no gel. Determinado o perfil de alelos para cada cepa, os MIRUs foram analisados comparativamente empregando o programa Bionumerics, Euclidiana (Applied Maths®) para construção do dendrograma.

Quadro 5: Correlação entre os tamanhos em pb dos amplificadores e os alelos de MIRU

Alelo	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678
7	773	714	855	936	976	518	771	642	869	863	911	732
8	826	791	908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110
15	1197	1330	1279	1360	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164

OBS: Quadro construído para permitir a correlação com amplificadores obtidos com Oligonucleotídeos Iniciadores desenhados segundo Supply *et al.*, 2001.

4. Resultados

Do total de 105 amostras clínicas foi verificado que 12 eram amostras em duplicata. Então foi realizada a identificação molecular de 93 isolados de *M. tuberculosis*. A tabela 1 ilustra a identificação das amostras proveniente do Clemente Ferreira (C.F.), que posteriormente foram renumeradas (Nº LAB), o sexo dos pacientes, data de entrada no Ambulatório e o perfil de resistência das amostras.

Tabela 1: Número de identificação, sexo, data de entrada e perfil de Resistência dos Isolados de *M. tuberculosis* dos pacientes do Instituto Clemente Ferreira.

Nº LAB	Nº C.F.	Sexo	Entrada	Terapêutica			
				EST	EMB	INH	RIF
1	38780	F	9/2/06	S	S	S	S
3	32326	M	17/2/06	S	S	S	S
4	35618	M	4/9/06	S	S	S	S
5	39358	M	23/5/06	R	R	R	S
7	35861	F	9/6/06	S	S	R	R
9	39712	F	7/6/06	R	S	R	R
10	39490	F	13/6/06	S	S	R	R
11	38936	M	14/6/06	R	R	R	R
12	39558	M	06	R	S	R	S
14	38582	M	18/7/06	R	S	R	R
15	39777	M	10/8/06	S	S	R	S
16	30813	M	23/8/06	S	S	S	S
17	39836	M	24/8/06	S	S	S	S
18	39847	F	29/8/06	S	S	S	S
19	39849	F	28/8/06	S	S	S	S
20	39683	M	28/8/06	S	S	R	R
21	20721	F	29/8/06	S	S	S	S
22	39884	F	24/8/06	S	S	S	S
23	34182	F	28/6/06	S	S	R	R
25	24799	M	15/9/06	S	S	S	S
26	39943	M	14/9/06	S	S	R	S
27	39890	F	14/9/06	R	R	R	R
28	33742	F	19/9/06	S	S	S	S
29	39944	M	14/9/06	S	S	S	S
30	39996	F	22/9/06	S	S	S	S

Continuação

31	36339	M	15/9/06	R	S	R	S
34	36594	M	22/9/06	R	R	R	R
35	40036	M	28/9/06	S	S	S	S
36	39824	M	18/9/06	R	R	R	R
37	32189	F	2/9/06	R	R	R	R
38	39967	M	19/9/06	S	S	S	S
39	40055	M	4/10/06	S	S	S	S
40	40152	M	29/9/06	S	S	S	S
41	39232	F	2/10/06	S	S	S	S
42	40063	M	5/10/06	S	S	S	S
43	36482	M	4/10/06	R	S	R	R
44	38170	F	5/10/06	S	S	S	S
45	40102	M	11/10/06	S	S	R	S
46	39954	M	6/10/06	R	S	R	R
48	41941/A	M	24/10/06	S	S	S	S
49	40117	M	17/10/06	S	S	S	S
50	40143	M	19/10/06	S	S	S	S
51	40134	F	19/10/06	S	S	S	S
52	37144	F	10/11/06	S	R	R	R
53	39052/A	M	31/10/06	S	S	S	R
54	40232	M	10/11/06	R	S	R	R
55	34697	F	22/11/06	R	R	R	R
56	38299	M	17/11/06	S	R	R	R
57	37754	M	29/11/06	S	S	R	R
58	40403	M	15/12/06	S	S	R	R
59	20059	F	19/12/06	S	R	R	R
60	39165	F	19/12/06	R	R	R	R
61	40382	F	7/12/06	R	R	R	R
63	33957	M	8/12/06	S	R	R	R
64	35861	F	17/12/06	S	S	R	R
65	38954	M	21/12/06	R	S	S	S
66	40417	M	18/1/07	S	S	S	S
67	40471	M	4/1/07	S	S	S	S
68	37954	M	27/1/07	S	S	S	S
69	40475	M	4/1/07	S	S	S	S
70	40476	F	3/1/07	S	S	S	S
71	40524	M	12/1/07	S	S	S	S
72	40360	F	8/1/07	S	S	S	S
73	35910	M	13/12/06	S	S	S	S
74	40557	M	16/1/07	S	S	R	S
75	40570	F	22/1/07	S	S	S	S
76	39508	M	8/1/07	S	S	R	R
77	40600	F	29/1/07	S	S	R	S

Continuação

78	40612	M	1/2/07	R	S	R	R
79	35497	M	18/1/07	R	S	R	R
80	38428	F	7/2/07	S	S	R	R
81	40648	F	7/2/07	R	S	R	R
82	34182	F	9/1/07	S	R	R	R
83	25141	M	15/2/07	S	R	R	R
84	22662	F	16/2/07	S	S	R	R
85	40687	M	3/2/07	R	R	R	R
86	33267	F	2007	S	R	R	R
88	34704	F	2007	R	R	R	R
93	173	F	2007	R	S	R	R
96	223 2697	M	2007	S	S	R	R
102	57 746	M	2007	S	S	R	R
105	179 2247	M	2007	S	S	S	S
106	192 2034	F	2007	R	S	R	R
109	218 2421	F	2007	R	R	R	R
110	254 2972	M	2008	S	S	S	S
150	41761	M	2008	R	R	R	R
165	36595	F	2008	R	R	R	R
167	41225	M	2008	R	R	R	R
171	41980	M	2008	R	R	R	R
183	36922	M	2008	R	R	R	R
184	41497	M	2008	R	S	S	S
08 451	08 451	M	2008	S	S	S	S
36 593	36 593	F	2008	R	R	R	R

R= Resistência; S= Sensível; M= Masculino; F=Feminino.

Informações quanto ao sexo e o perfil de resistência foram obtidos das 93 amostras estudadas. Os pacientes do sexo masculino representaram 60,2% (56) e do sexo feminino 39,8% (37) dos pacientes acometidos por tuberculose.

Quanto ao perfil de resistência, 58,1% (54) apresentaram resistência a INH, 50,5% (47) a RIF, 26,9% (25) a EMB e 34,4% (32) a EST. Quarenta e seis (49,5%) pacientes apresentaram resistência a INH e RIF, 24 (25,8%) apresentaram resistência a INH, RIF e EMB e 16 (17,2%) apresentaram resistência a INH, RIF, EMB e EST. Em sete isolados não foi possível realizar o teste de sensibilidade de pelo menos uma das drogas devido à contaminação.

4.1 – Diagnóstico Laboratorial

A pureza da cultura foi verificada pela bacterioscopia, através da coloração pela Ziehl Neelsen e observação de BAAR.

4.2 - Identificação Molecular dos isolados utilizando os Oligonucleotídeos Iniciadores INS1 e INS2

Foi realizada a PCR para identificação do *M. tuberculosis*, sendo encontradas em todas as 93 amostras a presença do produto de amplificação de 245 pb (Figura 1).

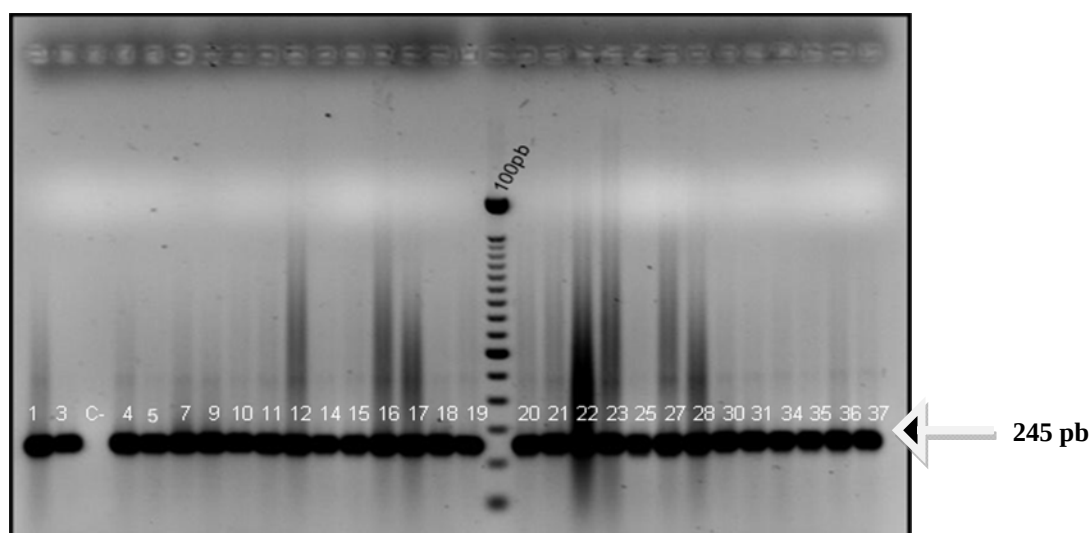


Figura 1: Fotografia do gel de agarose a 1% na confirmação molecular das cepas de *M. tuberculosis*, utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores INS1 e INS2 apresentando um fragmento de 245pb, um marcador de peso molecular de 100pb e o controle negativo (C-).

4.3 - Genotipagem pela técnica *Spoligotyping*

Após a confirmação da pureza da cultura bacteriana e da identificação do *M. tuberculosis* utilizando os Oligonucleotídeos Iniciadores INS1 e INS2 foi realizada a genotipagem por *Spoligotyping* dos 93 isolados clínicos. A Figura 2 ilustra a revelação da membrana pela técnica *Spoligotyping*.

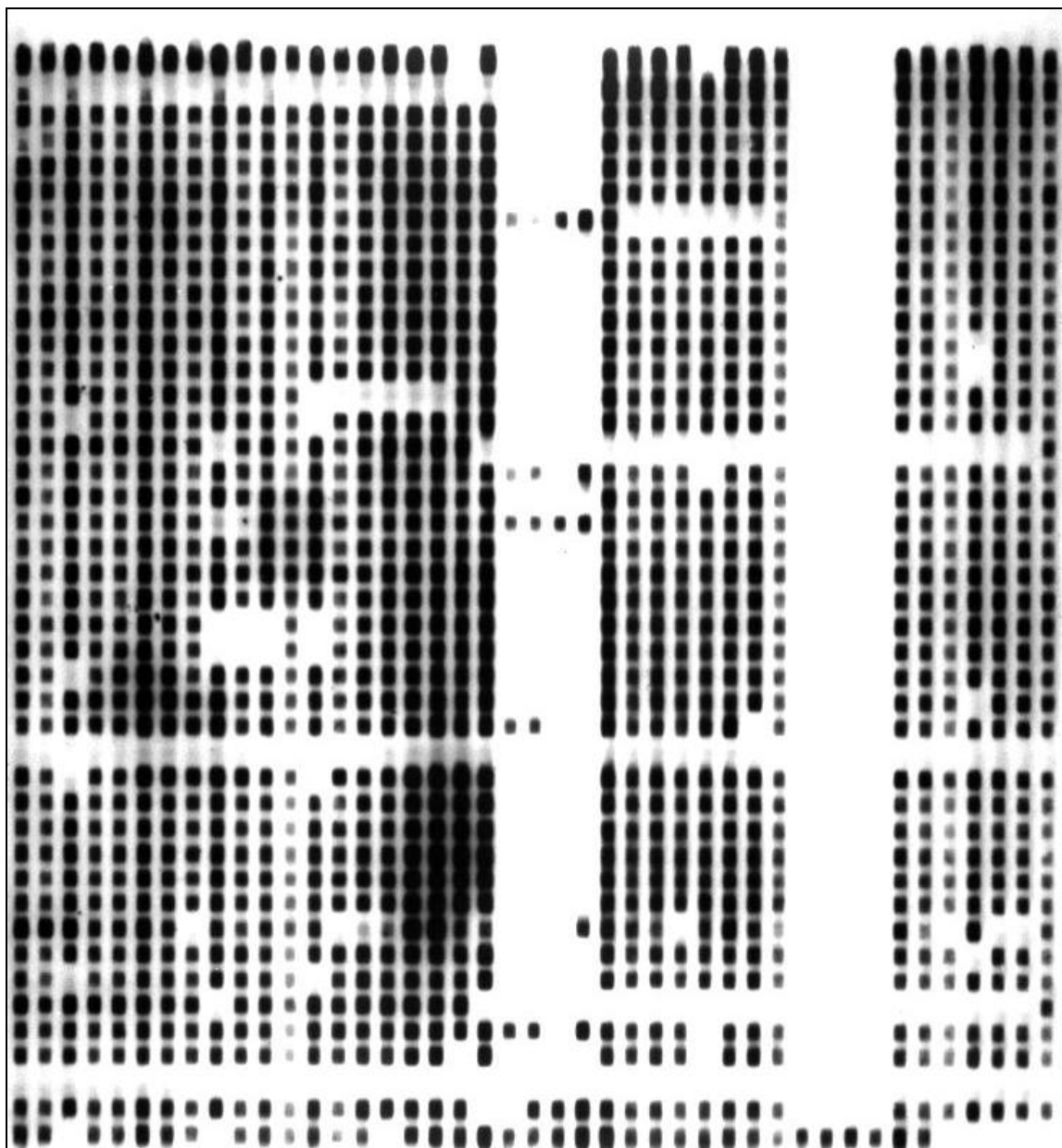


Figura 2: Revelação da membrana de *Spoligotyping* apresentando os perfis genéticos das amostras, em seguida, o controle negativo (C-), o controle positivo da cepa padrão do *M. tuberculosis* (H37Rv) e do *M. bovis* (BCG). As linhas representam as amostras e as colunas os oligonucleotídeos espaçadores.

Estes perfis genéticos visualizados pela hibridização com os oligonucleotídeos espaçadores foram transformados em valores numéricos, de maneira a obtermos um número de 15 dígitos (DALE *et al.*, 2001). Esta identificação facilita a comparação de amostras com bancos de dados interlaboratoriais.

Dos 93 isolados estudados, em 72 (77,4%) foi possível a identificação dos spoligotipos (SITs) presentes no SpolDB4, entretanto nos 21 (22,6%) restantes não foi possível esta identificação sendo identificados como ST. Na tabela 2 são apresentados a relação dos spoligotipos e identificação das famílias dos 72 isolados clínicos analisados pela técnica *Spoligotyping* e enquadrados nos spoligotipos (SITs) contidos no banco internacional SpolDB4. Os 72 (77,4%) foram classificados de acordo com o SpolDB4 em 36 spoligotipos (SITs) distribuídos em 7 famílias e 19 sub-famílias (T1, T1 (T4-CE1), T2, T2-T3, T3, H1, H3, LAM1, LAM2, LAM3, LAM4, LAM5, LAM6, LAM9, U, U (likely H), X3, Beijing e S) (tabela 2 e quadros de 6 a 12). Nenhuma família de Bovis, Afri ou *East African Indian* (EAI) e *Central and Middle Eastern Asia* (CAS) foram encontradas. A família *Latin-American-Mediterranean* (LAM) foi a mais freqüente entre as amostras analisadas representando 26 (28%) dos isolados, seguidos das famílias T com 24 (25,6%) e Haarlem (H) com 11 (11,8%) (tabela 2). Seis SITs acomodaram 51,4% (37/72) de todos os isolados identificados no SpolDB4 (SIT53, SIT50, SIT42, SIT60, SIT17 e SIT1) (Quadro 13). Dos 21 (22,6%) isolados restantes que apresentaram padrões de spoligotipos ainda não identificados no SpolDB4, SITVIT e Spotclust foram verificados 17 STs diferentes (tabela 4).

Tabela 2: Relação dos spoligotipos obtidos e a respectiva identificação de famílias, sub-famílias e spoligotipos dos 93 isolados de *M. tuberculosis*, de acordo com os bancos internacionais SpolDB4, SITVIT e Spotclust.

Amostras	Descrição do Spoligotipos	Famílias e sub-famílias	Spoligotipo (SIT)
1	777737777760471	T3	157
3	777777677560771	T1	453
4	776177607760771	LAM 03	33
5	777777477720771	-	-
7	000000000003771	Beijing	1
9	776177607760731	LAM 03	130
10	776177607460771	-	-
11	777777600000771	U	397
12	777777607760731	LAM 04	60
14	777777777760771	T1	53
15	777617777760771	T1	1214
16	777737777760471	T3	157
17	777777777760771	T1	53
18	777777777760771	T1	53
19	677737607760771	LAM 02	17
20	777777607760731	LAM 04	60
21	777777607760771	LAM 09	42
22	777357777760771	T1	1475
23	776173607760771	-	-
25	677777607760711	-	-
26	777777777720771	H3	50
27	777777777720771	H3	50
28	777777607460731	LAM 04	1895
29	777777777720771	H3	50
30	677777607760771	LAM 01	20
31	777777600000771	U	397
34	777777777720771	H3	50
35	743774077560731	-	-
36	777777677760731	T2	175
37	777777607400000	U	534
38	677777607660611	-	-
39	757777607560771	-	-
40	677737207760771	LAM 02	826
41	777777607760771	LAM 09	42
42	777777777420611	-	-
43	777777777760771	T1	53
44	777377637760771	-	-
45	777777777760601	T1	244
46	777777477720771	-	-
48	700076777760771	X3	92

Continuação

49	777777607560771	LAM 06	64
50	777777770000000	U (likely H)	46
51	777777607760771	LAM 09	42
52	777777777460771	T1	1905
53	777777777460771	T1	1905
54	77777777760771	T1	53
55	777777607760771	LAM 09	42
56	777777207760771	LAM 09	1277
57	777777607760771	LAM 09	42
58	00000000020771	H3	467
59	75737777760731	-	-
60	777777774020771	H1	47
61	77777777720771	H3	50
63	677700000160771	-	-
64	000000000003771	Beijing	1
65	000000000003771	Beijing	1
66	577776744760771	-	-
67	77777777720771	H3	50
68	77770377760771	T1	102
69	77773777760731	T2-T3	73
70	777777774020771	H1	47
71	77777777760771	T1	53
72	677737607720771	-	-
73	677737607760771	LAM 02	17
74	777777607760771	LAM 09	42
75	777000000000371	U	560
76	77637777760771	S	34
77	377777607760731	LAM 04	828
78	77777777760771	T1	53
79	777777737760771	T1	86
80	777677737760771	-	-
81	000000000003771	Beijing	1
82	776173607760771	-	-
83	77777777760771	T1	53
84	777737607760771	LAM 05	93
85	677737607760771	LAM 02	17
86	777777607760731	LAM 04	60
88	677737607760771	LAM 02	17
93	377777607760731	LAM 04	828
96	77777777760471	T1 (T4-CE1)	65
102	777760077620771	-	-
105	777437774020771	-	-
106	777777607760751	LAM 09	1154
109	777157607760771	-	-
110	777777477720771	-	-

Continuação			
150	77777777760771	T1	53
165	77777777720771	H3	50
167	77777607760731	LAM 04	60
171	77777777720771	H3	50
183	77777477720771	-	-
184	77777607760771	LAM 09	42
08 451	77777777760771	T1	53
36 593	77737777760771	T1	1166
(-) Spoligotipo não identificado no SpolDB4, SITVIT e Spotclust.			

Os quadros de 6 a 11 mostram a distribuição geográfica das 7 famílias e 19 sub-famílias encontradas sendo que no quadro 6 são descritos os 13 spoligotipos da família LAM. As sub-famílias mais prevalentes foram LAM2 com cinco isolados (SIT 17 com quatro isolados e SIT 826 com um), a LAM4 com sete isolados (SIT 60 com quatro, SIT 828 com dois, e SIT 1895 com um) e a LAM9 com 9 (SIT 42 com 7, SIT 1154 e 1277 com um isolados cada). Quanto à localização geográfica dos SITs encontrados, pode-se observar que o spoligotipo 1895 (SIT1895) é um tipo localizado, tendo sido descrito apenas no Brasil. Já os spoligotipos SIT33, SIT93, SIT1154 ainda não apresentam relatos de ocorrência no Brasil. No item Anexo foram listados os países e respectivas abreviaturas.

Quadro 6: Spoligotipos da família LAM descritos no banco internacional SpolDB4 identificados no

Instituto Clemente Ferreira.

Subclasses da Família LAM	Spoligotipos (SIT)	Nº de Isolados do C.F	Distribuição Geográfica	Nº de isolados SpolDB4
LAM1	20	1	ARG, AUS, AUT, BEL, BRA , CMR, CUB, DEU, ECU, ESP, EST, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, IDN, LBY, MEX, MOZ, MWI, NAM, NLD, PER, PHL, PRT, RUS, SWE, USA, VEN, VNM, ZAF, ZWE	426
LAM2	17	4	ARG, BRA , CMR, CUB, CZE, ESP, FXX, GLP, GUF, HTI, MEX, MTQ, MYS,	322

			NAM, NLD, PHL, PRT, USA, VEN	
	826	1	BRA , VEN	3
LAM3	33	1	ZAF	342
	130	1	AUT, BRA , CHL, CUB, ESP, ITA, MDG, USA, ZAF, ARG, BEL, FIN, FXX GBR, GUF, HND, HTI, ITAS, LBY, MDG, MEX, MOZ, NLD, PER, PRT, SWE, VEN	34
LAM4	60	4	ARG, AUT, BEL, BRA , CUB, DEU, DZA, ESP, FXX, GBR, LAM4, GNB, GUF, ITA, ITAS, MAR, MDG, MEX, MOZ, NLD, PRT, RUS, SEM, USA, VEM, ZAF, ZWE	83
	1895	1	BRA	02
	828	2	BRA , GNB	06
LAM5	93	1	VEN	188
LAM6	63	1	ARG, AUS, AUT, BEL, BRA , COM, CZE, DZA, FXX, GBR, GUF, IND, IRN, ITA, MDG, MEX, MTQ, MWI, MYS, PRT, SEM, USA, VEN	157
LAM9	42	7	ARG, ARM, AUS, AUT, AZE, BEL, BGD, BRA , CAF, CMR, CUB, CZE, DEU, DZA, EGY, ESP, EST, ETH, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, IDN, IND, IRN, ITA, ITAS, KAZ, KEN, LBY, LVA, MAR, MDG, MEX, MOZ, MTQ, MWI, MYS, NLD, NZL, PER, PHL, POL, PRT, PYF, RUS, SAL, SEM, SWE, THA, TUN, TUR, USA, VEM, VNM, ZAF, ZWE	1227
	1154	1	AUS, CZE, HTI, USA	7
	1277	1	ARG, BRA , USA	6

O quadro 7 apresenta treze spoligotipos da família T identificados no estudo. Dentro da família T com 24 isolados, 79,2% (19) dos isolados eram pertencentes a sub-família T1 (SIT 53 com dez isolados, SIT1905 com 2 isolados e os demais SITs com um isolado cada). Quanto à localização geográfica dos SITs encontrados na família T, nove deles não foram descritos no Brasil (SIT86, SIT102, SIT453, SIT1166, SIT1214, SIT1475, SIT65, SIT175 e SIT157).

Quadro 7: Spoligotipos da família T descritos no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto

Clemente Ferreira.

Subclasses da Família T	Spoligotipos (SIT)	Nº de Isolados do C.F	Distribuição Geográfica	Nº de isolados SpolDB4
T1	53	10	ANT, ARG, ARM, AUS, AUT, AZE, BEL, BGD, BRA , BRB, CAF, CAN, CHN, CIV, CMR, COM, CUB, CZE, DEU, DNK, DZA, EAFR, EGY, ESP, EST, ETH, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, HUN, IDN, IND, IRN, ITA, ITAS, JPN, KAZ, KEN, LBY, LVA, MAR, MDG, MEX, MNG, MOZ, MTQ, MWI, MYS, NAM, NLD, NOR, NZL, PAK, PER, POL, PRT, REU, ROM, RUS, SAL, SDN, SEM, SUR, SWE, THA, TUR, USA, VEN, VNM, ZAF, ZMB, ZWE	2497
	86	1	AUT, ESP, FXX, GUF, ITA, ITAS, MDG, NLD, TUR, USA, VEN	46
	102	1	RUS, USA, ZAF	46
	244	1	ARG, BEL, BGD, BRA , FXX, GNB, HTI, IND, MDG, NLD, PRT, USA	44
	453	1	GUF, PRT, SWE, USA	7
	1166	1	MWI, USA, VEN	8
	1214	1	DEU, GUF, MDG, POL	11
	1475	1	ARG, MWI, VEN	4
	1905	2	ARG, BRA	2
T1 (T4-CE1)	65	1	MTQ, SWE, USA	65
T2	175	1	ARG, FXX, HTI, ITA, PER, SUR, USA	18
T2-T3	73	1	AUS, AUT, BEL, BRA , EGY, FIN, FXX, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, IDN, ITA, MDG, MEX, MOZ, MTQ, NLD, PRT, SWE, USA, VEM, VNM, ZWE	114
T3	157	2	DEU, ITA, PRT	7

O quadro 8 apresenta os três spoligotipos identificados da família Haarlem. A sub-família mais importante foi a H3 (SIT50 com 8 isolados) com nove (81,8%) dos 11 isolados desta família. No aspecto geográfico, o ST467 ainda não foi descrito no Brasil.

Quadro 8: Spoligotipos da família H descritos no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.

Subclasses da Família H	Spoligotipos (SIT)	Nº de Isolados do C.F	Distribuição Geográfica	Nº de isolados SpolDB4
H1	47	2	ARG, ARM, AUS, AUT, AZE, BEL, BGD, BRA , CAF, CAN, CMR, CUB, CZE, DEU, DNK, ESP, EST, FIN, FXX, GBR, GLP, GNB, GUF, HTI, HUN, IND, ITA, ITAS, MAR, MDG, MEX, NLD, POL, PRT, ROM, RUS, SAL, SEN, SWE, TUR, USA, VEN, ZWE	721
H3	50	8	ARG, ARM, AUS, AUT, BEL, BOL, BRA , CAF, CHN, CIV, CMR, COM, CUB, CZE, DEU, DNK, DZA, EAFR, ESP, EST, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, HUN, IDN, IND, ITA, ITAS, JPN, KEN, LBY, MAR, MDG, MEX, MTQ, MYS, NLD, NZL, PAK, PER, POL, PRT, REU, ROM, RUS, SDN, SEM, SWE, THA, TUR, USA, VEN, VNM, ZAF, AUT, ESP, FXX, GUF, ITA, ITAS, MDG, NLD, TUR, USA, VEN	1504
	467	1	LBY,USA	5

A família U foi verificada em 5 (5,4%) dos isolados, sendo que os ST534 e ST560 nunca foram descritos na América do Sul (Quadro 9).

Quadro 9: Spoligotipos da família U descritos no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.

Subclasses da Família U	Spoligotipos (SIT)	Nº de Isolados do C.F	Distribuição Geográfica	Nº de isolados SpolDB4
U	397	2	ARG, BRA , ITAS, USA, VEN	12
	534	1	ESP, GNB	4
	560	1	GEO, RUS, USA	5

U (Likely H)	46	1	ARG, ARM, AUS, AUT, AZE, BEL, BGD, BRA , CAF, CAN, CMR, CUB, CZE, DEU, DNK, ESP, EST, FIN, FXX, GEO, GBR, GLP, GNB, GUF, HTI, HUN, IND, IDN, IRN, ITA, ITAS, MAR, MDG, MEX, MTQ, NLD, NZL, POL, SWE, TUR, USA, PRT, ROM, RUS, VNM, ZAF	95
--------------	----	---	---	----

Apenas um isolado clínico (ST34) foi encontrado na família S, sendo este SIT ainda não encontrado no Brasil (Quadro 10).

Quadro 10: Spoligotipo da família S descrito no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.

Família S	Spoligotipos (SIT)	Nº de Isolados do C.F	Distribuição Geográfica	Nº de isolados SpolDB4
S	34	1	ARG, ARM AUT, AZE, BEL, CHN, CZE, DEU, ESP, EST, FIN, GBR, GLP, MOZ, MWI, NLD, NZL, PRT, REU, SAL, SWE, THA, USA, VEN, VNM, ZAF	362

Na família X foi enquadrado o isolado clínico ST92, sendo este já identificado no Brasil. (Quadro 11).

Quadro 11: Spoligotipo da família X descrito no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.

Família	Spoligotipos (SIT)	Nº de Isolados do C.F	Distribuição Geográfica	Nº de isolados SpolDB4
X	92	1	ARG, AUS, BRA , DEU, ESP, FXX, GLP, GUF, HTI, ITA, ITAS, NLD, NZL, USA ZAF, ZWE	123

Foram identificados 4 (4,3%) isolados clínicos pertencentes a família Beijing (Quadro 12).

Quadro 12: Spoligotipo da família beijing descrito no banco internacional SpolDB4 identificados no Instituto Clemente Ferreira.

Família	Spoligotipos (SIT)	Nº de Isolados do C.F.	Distribuição Geográfica	Nº de isolados SpolDB4
Beijing	1	4	ARG, AUT, BEL, BRA , CUB, CZE, DEU, DNK, DZA, ESP, FIN, FXX, GLP, GUF, HTI, IND, ITA, LBY, MEX, MTQ, NLD, POL, RUS, TUR, USA, ZAF, ZWE	3758

Os dados dos seis principais SITs do total de 72 isolados clínicos de *M. tuberculosis*, identificados no SpolDB4 encontrados em São Paulo, incluindo a distribuição geográfica, são apresentados no quadro 13.

Quadro 13: Principais *Shared International Spoligotypes* (SITs) encontrados em São Paulo.

SITs	Distribuição Geográfica	Sub-família	Nº isolados do C.F.	Porcentagem (%)
17	ARG, BRA , CMR, CUB, CZE, ESP, FXX, GLP, GUF, HTI, MEX, MTQ, MYS, NAM, NLD, PHL, PRT, USA, VEN	LAM2	4	5,6
60	ARG, AUT, BEL, BRA , CUB, DEU, DZA, ESP, FXX, GBR, LAM4, GNB, GUF, ITA, ITAS, MAR, MDG, MEX, MOZ, NLD, PRT, RUS, SEM, USA, VEN, ZAF, ZWE	LAM4	4	5,6
42	Ubiquitário comum	LAM9	7	9,7
53	Ubiquitário comum	T1	10	13,8
50	Ubiquitário comum	H3	8	11,1
1	Ubiquitário comum	Beijing	4	5,6
	Total		37	51,4

Na tabela 3 estão relacionados os 21 (22,6%) isolados restantes que apresentaram padrões de spoligotipos ainda não identificados no banco de dados SpolDB4 e SITVIT. Foram verificados 17 STs diferentes e 2 grupos clonais sendo um

com 4 isolados (5, 46, 110 e 183) e outro com dois (23 e 82). Os STs foram analisados pelo Spotclust (disponível em: <http://cgi2.cs.rpi.edu/~bennek/SPOTCLUST.html>) possibilitando determinar a porcentagem de similaridade dos STs com as sub-famílias já descritas.

Tabela 3. Spoligotipos não descritos nos bancos internacionais SpolDB4, SITVIT e Spotclust identificados entre os isolados do Instituto Clemente Ferreira.

Spoligotipo	Nº de isolados	Nº das Amostras	Descrição do Spoligotipo	% Similaridade/ Subfamília
ST1	4	5, 46, 110 e 183	777777477720771	11% T1, 39% H3 e 48% H37Rv
ST2	1	10	776177607460771	99% LAM9
ST3	2	23 e 82	776173607760771	99% LAM3
ST4	1	25	677777607760711	66% LAM1 e 33% LAM9
ST5	1	35	743774077560731	98% H37Rv
ST6	1	38	677777607660611	66% LAM1 e 33% LAM9
ST7	1	39	757777607560771	99% LAM9
ST8	1	42	777777777420611	66% H3 e 25% T1
ST9	1	44	777377637760771	99% T1
ST10	1	59	757377777760731	99% T1
ST11	1	63	677700000160771	99% T4
ST12	1	66	577776744760771	65% X1 e 35% T1
ST13	1	72	677737607720771	81% LAM2 e 10% LAM1
ST14	1	80	777677737760771	99% T1
ST15	1	102	777760077620771	96% H37Rv
ST16	1	105	777437774020771	99% H1
ST17	1	109	777157607760771	99% LAM9

O ST1 apresentou similaridade de 11% com a sub-família T1, 39% com a H3 e 48% com H37Rv. Os STs 2, 7 e 17 apresentaram similaridade de 99% com a LAM9 e mesma similaridade foi verificada para o ST3 com a LAM3. O ST4 e o ST6 apresentaram 66% de similaridade com a LAM1 e 33% com a LAM9, o ST13 81% com a LAM2. Os STs 9, 10 e 14 apresentaram similaridade de 99% com a T1, o ST11 a mesma similaridade com a T4 e o ST12 35% com T1 e 65% com a X1. Os STs 5 e 15 alcançaram similaridade superior a 95% com a cepa padrão H37Rv. O ST16 foi similar a

H1 em 99% e o ST8 em 66% com a H3 e 25% com a T1.

Os perfis genéticos descritos na tabela 2 e nos quadros de 6 a 12 foram analisados com o auxílio do Bionumerics, Euclidiana, gerando o dendrograma apresentado na Figura 3. Do total de 93 isolados foram encontrados 53 spoligotipos (36 SITs e 17 STs) distintos, sendo que 51 (54,8%) amostras agruparam-se em 12 grupos clonais com similaridade de 100%. Destes, 10 *cluster* são de SITs sendo 4 grupos de dois isolados cada (11 e 31; 60 e 70; 77 e 93; 52 e 53;), 3 contendo 4 isolados cada (7, 64, 65 e 81; 12, 20, 86 e 167; 19, 73 85 e 88;), 1 contendo 7 isolados (21, 41, 51, 55, 57, 74, 184), 1 contendo 8 isolados (26, 27, 29, 34, 61, 67, 165, 171) e 1 contendo 10 isolados (14, 17, 18, 43, 54, 71, 78, 83, 150, 08 451), e mais dois *clusters* de STs, sendo um com 4 isolados (5, 46, 110 e 183) e outro com dois isolados (23 e 82). No dendrograma os quatro isolados do ST1 (5, 46, 110 e 183) em *cluster*, apresentaram genótipo com similaridade de 93% com o SIT 50 da sub-família H3, diferindo deste apenas pela ausência dos espaçadores 20 e 21. O ST3 com dois isolados (23 e 82) em *cluster*, eram similares em 87% com o SIT 33 da sub-família LAM3, diferindo de dois espaçadores (ausência do espaçador 13 e presença do 15).

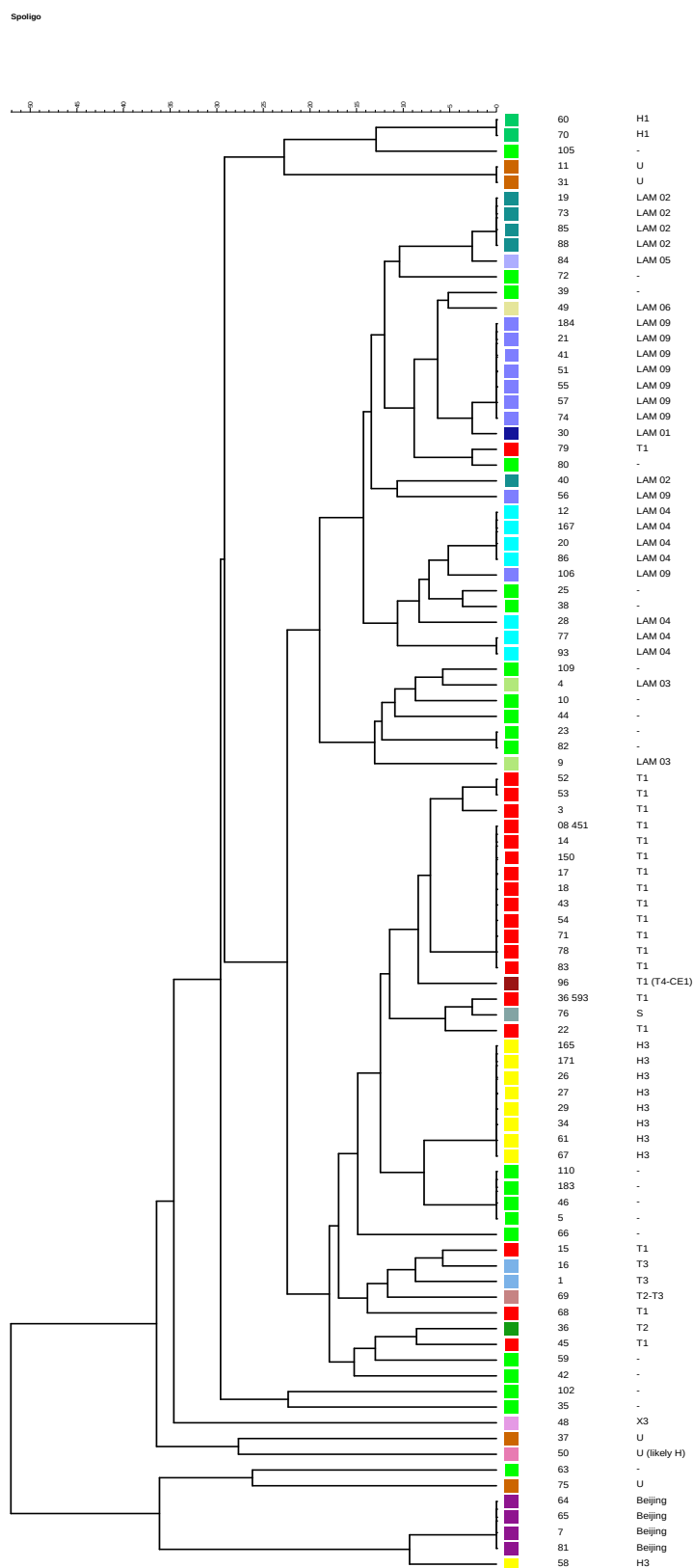


Figura 3: Dendrograma produzido com os resultados obtidos pela técnica de *Spoligotyping*.

4.4 - Genotipagem pela técnica MIRU

Foi realizada a técnica de genotipagem MIRU dos 93 isolados clínicos reconfirmados como de *M. tuberculosis* pela PCR - IS6110. A tabela 4 mostra o número de cada cepa estudada e seu alelo para cada oligonucleotídeo iniciador de MIRU analisado.

Tabela 4: Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados de *M. tuberculosis* submetidos a técnica de MIRU

MIRU AMOSTRAS	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
1	1	2	4	3	2	3	0	4	2	2	1	2
3	0	2	4	3	2	6	0	4	2	2	1	1
4	1	2	4	3	2	4	0	5	2	3	1	2
5	1	2	5	2	0	2	0	5	2	2	1	2
7	2	2	3	1	2	6	1	5	2	3	3	1
9	1	2	3	1	1	5	1	4	2	2	0	3
10	1	2	3	3	1	5	0	5	2	1	1	2
11	0	2	3	2	2	4	0	6	2	1	0	3
12	1	2	4	3	2	5	1	3	2	3	2	4
14	1	2	3	2	2	5	1	5	2	3	2	2
15	2	2	2	2	2	5	0	5	2	3	1	1
16	0	2	4	2	1	5	0	3	2	1	1	4
17	2	2	2	0	1	4	0	2	2	2	0	4
18	2	2	2	2	1	5	0	3	2	2	1	5
19	2	2	3	1	1	4	1	6	2	2	1	1
20	0	2	3	2	2	5	1	3	2	2	1	4
21	1	2	3	0	1	6	0	5	2	2	1	1
22	0	2	3	1	1	5	1	3	2	1	1	4
23	2	2	3	1	1	5	0	5	2	3	1	3
25	2	3	2	1	1	5	0	4	2	3	1	1
26	2	2	5	3	0	2	1	5	2	2	1	3
27	2	2	5	2	1	4	1	5	2	3	1	3
28	0	2	3	1	1	5	0	4	2	1	1	2
29	2	2	3	2	0	2	1	5	2	3	1	3
30	2	2	2	1	1	7	0	4	2	2	1	1
31	1	2	3	2	0	4	0	5	2	1	1	3
34	1	2	7	2	1	3	0	5	2	3	1	2
35	0	2	5	3	1	4	0	4	2	2	0	4
36	1	2	3	2	1	4	0	3	2	3	1	7
37	1	2	5	1	0	4	0	4	2	1	1	0
38	1	2	2	2	1	4	0	6	2	2	1	4

Continuação

39	1	2	5	2	1	4	0	5	2	2	1	1
40	1	2	1	1	1	3	0	4	2	3	1	1
41	1	2	4	0	1	4	0	4	1	3	1	1
42	1	2	6	3	1	3	0	6	0	3	1	1
43	2	2	4	2	2	5	1	1	2	1	2	1
44	1	2	4	3	1	6	0	5	2	3	1	3
45	1	2	3	1	1	3	1	5	2	2	1	3
46	1	2	4	3	0	1	1	5	2	3	1	4
48	1	2	4	2	1	3	0	5	2	1	0	4
49	0	2	1	3	1	4	1	5	2	1	1	2
50	2	2	3	3	2	3	1	5	2	3	1	1
51	1	2	4	2	2	4	0	4	2	1	1	1
52	1	2	4	3	2	4	0	4	2	3	2	4
53	2	2	3	1	1	3	1	5	2	3	1	4
54	2	1	2	2	2	3	1	1	2	2	1	3
55	1	2	3	1	0	0	1	4	1	3	1	1
56	2	2	4	3	2	4	1	4	2	3	2	3
57	2	2	4	1	2	6	0	4	1	3	1	1
58	2	2	4	3	1	2	1	4	2	3	2	3
59	2	2	3	2	2	4	1	4	2	3	2	3
60	2	2	5	2	1	2	0	5	2	3	1	4
61	2	2	3	3	1	2	1	5	2	3	2	
63	2	2	4	3	2	5	1	3	2	3	1	1
64	2	2	3	3	2	1	1	7	2	4	1	2
65	2	2	3	4	2	5	1	7	3	4	2	3
66	2	2	4	3	2	5	1	5	3	2	1	2
67	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	1	3
68	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	1	2
69	2	2	4	3	2	5	1	6	3	1	1	1
70	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	1	4
71	2	2	3	3	2	5	1	6	3	2	1	4
72	2	2	4	2	2	5	1	6	3	2	1	1
73	2	2	4	3	2	5	1	4	3	2	1	1
74	2	3	4	1	2	6	1	3	2	3	1	1
75	1	2	4	4	2	5	0	4	3	1	1	1
76	3	2	3	3	2	5	1	4	3	3	1	4
77	2	2	5	2	2	6	1	4	3	3	0	1
78	2	2	4	2	2	5	1	4	3	3	0	1
79	1	2	3	3	2	6	1	4	3	2	0	4
80	2	2	3	4	2	6	1	5	3	3	1	2
81	2	2	3	3	2	5	1	8	3	5	0	3
82	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	0	3
83	2	2	3	1	2	6	1	4	2	3	0	1
84	2	2	4	0	2	6	1	5	3	3	0	1
85	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	0	1

Continuação

86	1	2	4	3	2	6	0	3	3	3	0	4
88	2	2	4	1	2	4	1	5	1	3	2	5
93	1	3	3	2	2	3	1	4	2	3	2	2
96	2	2	4	3	2	4	1	4	2	3	2	2
102	2	2	5	3	2	2	1	5	2	3	2	2
105	2	2	5	2	2	3	1	5	1	2	2	4
106	2	2	4	3	2	3	1	3	2	3	2	1
109	2	0	3	2	2		1	1	2	3	0	1
110	2	2	4	2	2		1	5	2	3	2	2
150	2	0	4	3	2	4	1	1	3	3	0	1
165	2	2	6	3	2	4	1	5	2	3	2	4
167	2	2	4	1	2	7	1	3	1	2	2	1
171	2	2	6	2	2	3	1	5	2	2	2	4
183	2	2	5	3	2	4	1	5	2	3	2	6
184	2	2	4	2	2	5	1	3	2	2	2	1
08 451	2	2	3	0	2	4	1	2	2	3	2	8
36 593	1	2	2	2	2	4	1	3	2	2	2	4

Nos isolados 109 e 110 não foi possível a amplificação do MIRU *locus* 23 e no isolado 60 o MIRU *locus* 40, mesmo após 5 repetições. Os MIRUs *loci* 10, 23, 26, 40, foram os mais discriminatórios, sendo que o *loci* 26 e 40 foram os mais polimórficos com até com 8 alelos, seguido do *loci* 23 e 10 com até 7 alelos. Em todos os isolados analisados, no *locus* 24 foi verificado apenas alelos 0 ou 1.

A figura 4 ilustra o dendrograma produzido com os resultados obtidos pela técnica de MIRU onde não foi encontrada a formação de grupos genéticos com 100% de similaridade. A técnica de MIRU gerou 93 genótipos diferentes. Entretanto, foram encontrados 4 grupos de dois isolados cada com 97% de similaridade (67 e 70; 84 e 85; 66 e 68; 56 e 96), 5 grupos de dois isolados cada com 96% (105 e 171; 58 e 61; 77 e 78; 69 e 72; 102 e 110), 5 grupos de dois isolados cada com 95% (1 e 4; 184 e 63; 16 e 22; 12 e 52; 45 e 53).

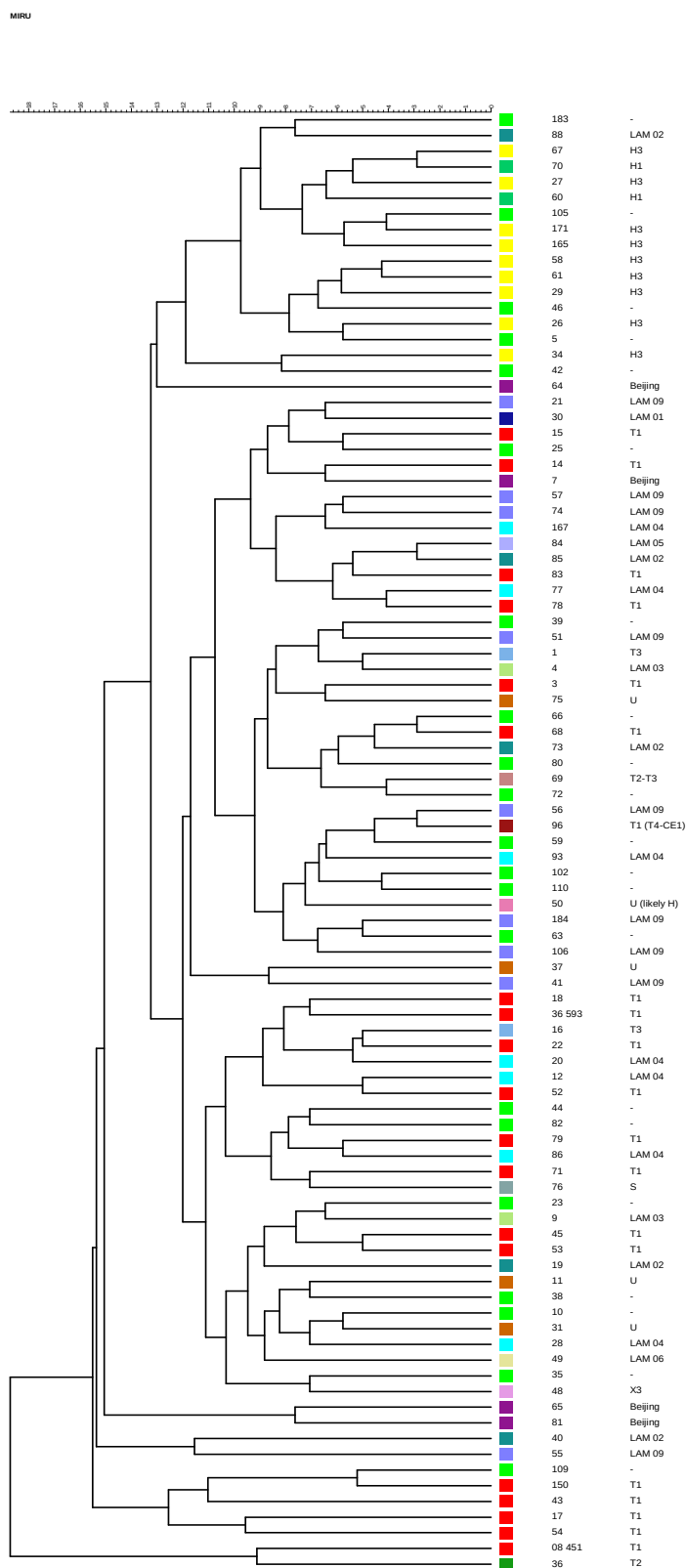


Figura 4: Dendrograma produzido com os resultados obtidos pela técnica de MIRU.

4.5 Associação das técnicas de *Spoligotyping* e de MIRU

A análise combinatória das duas técnicas de epidemiologia molecular foi realizada no programa Bionumerics (versão 4.5) e a figura 5 ilustra o dendrograma resultante desta análise. Entre os 93 isolados analisados, a combinação das duas técnicas evidenciou ausência de grupo clonal nesta população estudada, gerando 93 genótipos independentes. Os isolados agrupados pela técnica de *Spoligotyping* em 12 *cluster* com 100% de similaridade, foram separados quando associados com a técnica de MIRU. Mesmo assim, os isolados destes grupos clonais apresentaram similaridade de até 91 % (SIT 1 de 92%, SIT 397 de 96%, SIT 47 de 97%, ST (23 e 82) de 96%; SIT 60 de 94%; SIT 828 de 94%; SIT 42 de 91%; SIT 17 de 93%; SIT 53 de 90%, SIT 1905 de 95%, ST (5, 46, 110 e 183) de 93% e SIT 50 de 95%). Entretanto, a técnica de MIRU também evidenciou que dentro de cada agrupamento de Spoligotipos, haviam isolados que eram mais próximos entre si. Assim na família Beijing, dentro do SIT 1 com 4 isolados, o MIRU demonstrou que a similaridade entre os isolados 65 e 81 era de 96%, destes para o 64 de 93,5% e destes três para o último isolado (7) de 92%. Dentro do maior grupo SIT 53 da sub-família T1, com 10 isolados, a similaridade entre eles foi de 93%, entretanto entre os isolados 78 e 83 é de 97% e entre 17 e 18 de 96%. A mesma situação pode ser observada para os *clusters* dos SITs 50, 60, 42 e 17.

Spoligo+MIRU

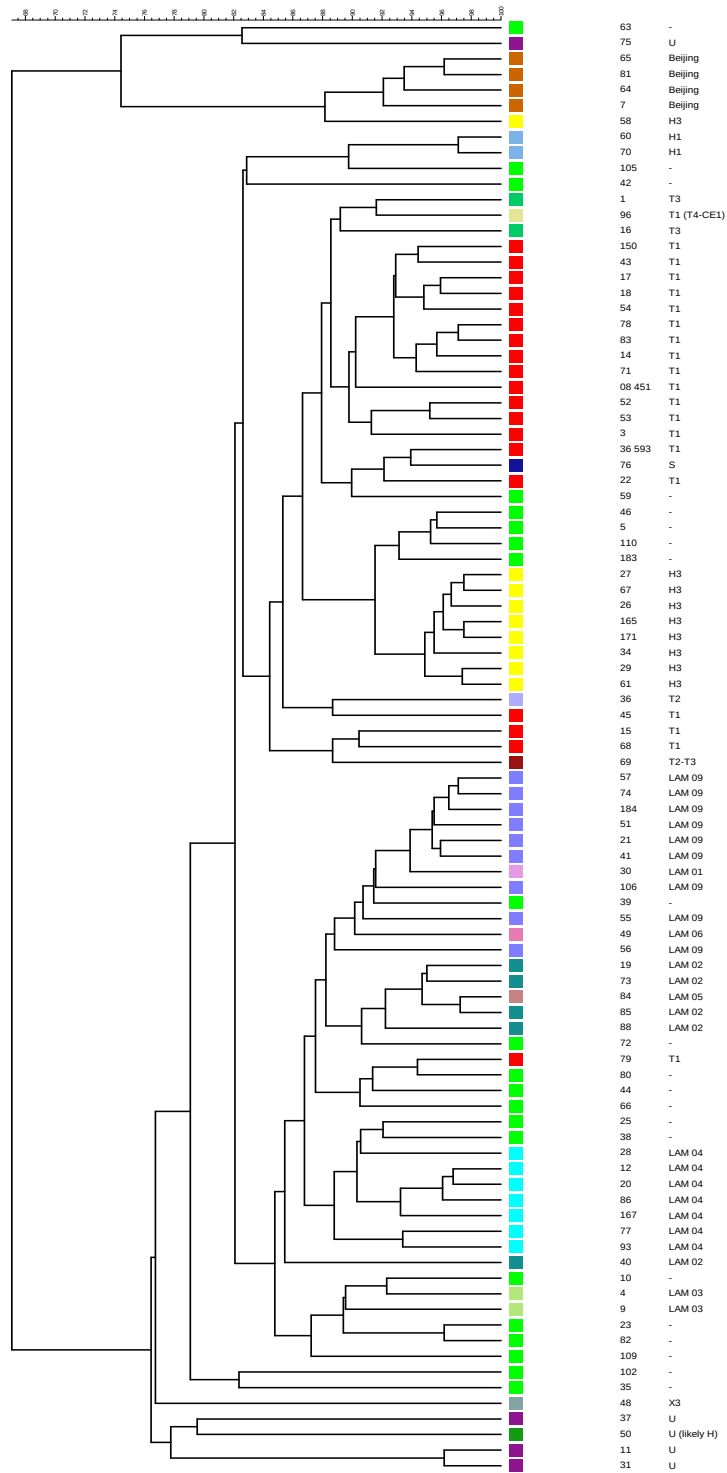


Figura 5: Dendrograma dos 93 isolados avaliados por *Spoligotyping* e MIRU.

O resultado resumido do poder discriminatório de cada técnica de tipagem, destacando os 12 grupos clonais gerados pela técnica de *Spoligotyping*, os 12 *loci* de MIRU destes isolados em *cluster* e perfil de resistência dos respectivos pacientes, são apresentados no quadro 14.

Quadro 14: Similaridade entre os grupos clonais realizados pela técnica de *Spoligotyping* e os resultados obtidos pelo MIRU.

Grupo	Amostras	<i>Spoligotyping</i> Família	Spoligotipo	MIRU	Resistência
1	7 64 65 81	Beijing	1	223126152331 223321172412 223425173423 223325183503	INH; RIF INH; RIF EST INH; RIF; EST
2	11 31	U	397	023224062103 123204052113	INH; RIF; EST; EMB INH; EST
3	60 70	H1	47	225212052314 225313153314	INH; RIF; BEM -
4	23 82	ST		223115052313 224226153303	INH; RIF INH; RIF; EMB
5	12 20 86 167	LAM04	60	124325132324 023225132214 124326033304 224127131221	INH; EST INH; RIF INH; RIF; EMB INH; RIF; EST; EMB
6	77 93	LAM04	828	225226143301 133223142322	INH INH; RIF; EST
7	21 41 51 55 57 74 184	LAM09	42	123016052211 124014041311 124224042111 123100141311 224126041311 234126132311 224225132221	- - - INH; RIF; EST; EMB INH; RIF INH EST
8	19 73 85 88	LAM02	17	223114162211 224325143211 224126153301 224225132221	- - INH; RIF; EST; EMB INH; RIF; EST; EMB
9	14 17 18	T1	53	123225152322 222014022204 222014022204	INH; EST - -

	43			222215032215	INH; RIF; EST
	54			212223112213	INH; RIF; EST
	71			212223112213	-
	78			223325163214	INH; RIF; EST
	83			224225143301	INH; RIF; EMB
	150			223126142301	INH; RIF; EMB
	08 451			223024122328	-
10	52	T1	1905	124324042324	INH; RIF; EMB
	53			223113152314	RIF
11	5	ST		125202052212	INH; EST; EMB
	46			124301152314	INH; RIF; EST
	110			22422 152322	-
	183			225324152326	INH; RIF; EST; EMB
12	26	H3	50	225302152213	INH
	27			225214152313	INH, RIF; EST, EMB
	29			223202152313	-
	34			127213052312	INH; RIF; EST; EMB
	61			22331215232	INH; RIF; EST; EMB
	67			225313153313	-
	165			226324152324	INH; RIF; EST; EMB
	171			226223152224	INH; RIF; EST; EMB

ST: *Shared-types*; (-): Sensível a todas as drogas; INH: Isoniazida; RIF: Rifampicina; EST: Estreptomicina; EMB: Etambutol.

Do total de 39 pacientes agrupados pela técnica de *Spoligotyping*, em todas as sub-famílias e SITs estavam presentes os isolados MDR. Apesar do baixo número de isolados em cada *cluster* de *Spoligotyping*, é possível verificar que para cada SIT e sub-família, determinados *loci* de MIRU foram mais discriminatórios. Por exemplo, os sete isolados da subfamília LAM9 e SIT 42, apresentaram polimorfismo já no *locus* 2, sendo que três isolados apresentaram dois alelos e quatro isolados, apenas um alelo. Ainda no mesmo SIT 42, polimorfismos foram verificados nos *loci* 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31 e 39. Por outro lado, na SIT 1 da família Beijing, com quatro isolados, o polimorfismo de alelos foi verificado apenas a partir do *locus* 16, continuando com os *loci* 23, 26, 27, 31, 39 e 40.

5. Discussão

A tuberculose é uma doença crônica de transmissão aérea que aflige a humanidade há mais de 5 milênios. O *M. tuberculosis* é provavelmente o patógeno responsável pelo maior número de mortes até o momento, e segundo dados estimados pela Organização Mundial de Saúde um terço da população mundial está infectada com o bacilo e cerca de 8 a 10 milhões de casos novos acontece a cada ano, com dois milhões de mortes (CUNHA *et al.*, 2009). No Brasil, em 2008 foi verificado 70.989 novos casos de tuberculose com uma incidência de 37/100.000 habitantes e 4.735 óbitos (WHO – *World Health Organization*, 2010). Ela é caracterizada como doença social, onde a superpopulação, desnutrição e falta de infra-estrutura básica são fatores de importância na transmissão da doença (MARQUES & CUNHA, 2003).

Entre os países mais desenvolvidos, o impacto da doença sobre a população foi reduzido através da melhoria nas condições de vida observada em meados do século XIX, e tornou-se ainda menor pela implementação da quimioterapia efetiva nos últimos 50 anos. Nos países ainda em desenvolvimento, a tuberculose manteve-se como um sério problema de saúde pública (MANJUBA *et al.*, 2008).

O Estado de São Paulo é o mais populoso do Brasil com estimativa em 2008 de 41.139.672 habitantes, dividido em 645 municípios, ocupando uma área de 248.209.426 quilômetros quadrados. Considerado o "motor econômico" do Brasil, o estado de São Paulo é o mais rico e modelo entre os estados com alto Índice de Desenvolvimento Humano, abrigando o maior parque industrial e a maior produção econômica (<http://www.saopaulo.com.br/acidade.htm>). Sua população é a mais diversificada e mais populosa do Brasil, descende principalmente de portugueses que descobriram o Brasil e instalaram as primeiras vilas exatamente no estado de São Paulo e de imigrantes italianos, ameríndios, africanos além de outras grandes correntes

migratórias, como árabes, alemães, espanhóis e japoneses. Sua capital, o município de São Paulo tem uma população da região metropolitana de 10.434.252 milhões de habitantes, segundo último censo de 2007 e uma área de 1.509 quilômetros quadrados. Isso significa uma densidade demográfica de mais de 7 mil habitantes por quilômetro quadrado, um número muito maior que a média do Estado (165,75 hab./km²). Detém o maior registro de imigrantes, quase 3 milhões de 70 diferentes nacionalidades e, como também não poderia deixar de ser, evidenciando toda a complexidade do Estado mais cosmopolita da América do Sul (<http://www.saopaulo.com.br/acidade.htm>).

Sendo assim, o estado de São Paulo tem uma alta prevalência de tuberculose, com cerca de 21.000 casos por ano e aproximadamente de 18.000 casos novos. O município de São Paulo é responsável por uma incidência de 65,2/100.000 habitantes e em 2009 foram registrados 6.769 casos dos quais 5777 eram de casos novos, 399 de recidiva e 520 fizeram retratamento após abandono (http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_tb.html).

No controle da tuberculose, a cidade de São Paulo conta com o Instituto Clemente Ferreira fundado em 1913, que é Centro de Referência para todo o Estado de São Paulo na abordagem da tuberculose e outras doenças pulmonares, sendo referência nacional no combate a doença. O ambulatório do instituto é responsável pelo atendimento, tratamento e acompanhamento dos doentes na cidade de São Paulo, sendo especializado em atender pacientes com dificuldades no tratamento.

Noventa e três isolados clínicos de *M. tuberculosis*, provenientes de pacientes atendidos no Instituto Clemente Ferreira de fevereiro de 2006 a janeiro de 2008, constituíram o montante de amostras estudadas. A aplicação da PCR-IS6110 confirmou pela amplificação do fragmento de 245pb, a identificação de *M. tuberculosis* em todos os isolados. Entretanto, nosso laboratório, em trabalhos retrospectivos, analisando cepas

de *M. tuberculosis* provenientes do mesmo Instituto e do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, verificou ausência do IS6110 em cerca de 5% total de aproximadamente 500 cepas analisadas (dados não publicados). Segundo van Soolingen *et al.* (1993) em algumas cepas de *M. tuberculosis* provenientes da Índia e do Vietnã (YUEN *et al.*, 1993), foram verificadas também ausência desta sequência de inserção, gerando um resultado falso negativo.

A avaliação dos dados epidemiológicos dos 93 pacientes identificou que 60,2% eram provenientes de pacientes do sexo masculino e 39,8% do sexo feminino, e que 46 (49,5%) dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* eram MDR. Estes dados são discordantes de literaturas pertinentes, onde a relação entre os sexos é de cerca de 3x maior para o sexo masculino (MALASPINA, 2004; SANTOS, 2009; SEVERO&LEITE 2005). Estudo realizado por Melo *et al.* (2003), no mesmo Instituto, de 182 pacientes, 112 (61,5%) eram do sexo masculinos e todos MDRs. Apesar do nosso estudo apresentar um viés devido a pequena amostragem frente ao grande contingente de casos de tuberculose da cidade de São Paulo, os dados revelam a característica deste ambulatório em atender principalmente pacientes com dificuldade no tratamento. Estudos citados por Jardim *et al.* (2001) mostrou que no Brasil, as cepas MDR em sua maioria são “adquiridas”, em consequência de falhas do tratamento, tais como a irregularidade, o abandono e prescrições inadequadas.

Com respeito à epidemiologia molecular da tuberculose, este estudo é bastante escasso no Brasil (MALAGNI *et al.*, 2009; MALASPINA *et al.*, 2008), sendo ainda menor, o número de publicações que avaliam a diversidade genética dos isolados clínicos da cidade de São Paulo (FERRAZOLI *et al.*, 2000).

Desta forma, para caracterizar a diversidade genética da população de *M. tuberculosis*, a técnica de *Spoligotyping* foi aplicada por dois anos consecutivos nos

isolados clínicos provenientes de pacientes da grande área metropolitana de São Paulo e atendidos no ambulatório do Instituto Clemente Ferreira. A técnica de *Spoligotyping* é altamente reprodutível, sendo utilizada para abordar linhagens circulantes numa determinada região. Aliado a organização de uma base de dados internacional de spoligotipos, esta técnica tornou possível, uma visão global da distribuição geográfica dos genótipos (FILLOL *et al.*, 2002 e 2003) bem como a proveniência geográfica de cepas isoladas (DAVID *et al.*, 2004).

As principais famílias encontradas neste estudo foram a LAM, T e Haarlem (respectivamente em 28%, 25,8% e 11,8%), representando 65,6% dos isolados estudados. Dados semelhantes foram encontrados no estudo realizado no Hospital Fernando Fonseca de Lisboa em Portugal, com 249 isolados (DAVID *et al.*, 2004). Esta cidade também se caracteriza por ser densamente povoada e com alta incidência de tuberculose. Neste mesmo estudo (DAVID *et al.*, 2004), a família LAM foi a predominante com 29,2% do total. A incidência das mesmas famílias de *M. tuberculosis* encontradas na cidade de São Paulo e de Lisboa pode ser uma indicação da intensa relação Brasil/Portugal principalmente nas duas capitais. No estudo realizado por Silva *et al.* (2009), no Rio Grande do Sul as famílias LAM, Haarlem e T foram as mais prevalentes. Noguti, *et al.* (2010) estudando os isolados clínicos de *M. tuberculosis*, verificaram também a predominância destas três famílias em Maringá –PR. Malaspina *et al.* (2008), estudando população de Araraquara-SP, onde a incidência da tuberculose é baixa, verificaram predominância da família T. As três famílias (LAM, T e Haarlem) são as mais freqüentes encontradas na África, na América do Sul e Central e na Europa (BRUDEY *et al.*, 2006).

As outras famílias encontradas nos isolados de São Paulo foram as famílias U (5 isolados), Beijing (4 isolados), S e X com 1 isolado cada. Não foi surpresa encontrar

dentre as famílias, a Beijing que contribuiu com 4,3% dos SIT identificados. Originário da China, cerca de 50% dos membros desta família são encontradas na Ásia Oriental. Entretanto uma média de 4% já são encontrados na Europa, principalmente na Europa Oriental (MORCILLO *et al.*, 2005). O genótipo das cepas da família Beijing foi extensivamente estudado devido as suas características altamente epidêmicas e resistentes aos medicamentos, causando diversos focos de infecção ao resto do mundo. As cepas Beijing podem geneticamente ser mais invasivas e mais propensas para adquirir resistência aos fármacos (MORCILLO *et al.*, 2005). Portanto, neste estudo, a participação da família Beijing em 4,3% do total de isolados identificados no SpolDB4, pode estar relacionado com a imigração de populações asiáticas e da Europa Oriental para o Brasil, principalmente para a cidade de São Paulo. Malaspina *et al.* (2008), não relatou a presença desta família dentre os isolados de Araraquara, interior de São Paulo, mas ela foi encontrada em outras localidades brasileiras (BRUDEY *et al.*, 2006). Segundo David *et al.* (2007) em Portugal os spoligotipos de Beijing são bem frequentes.

Não foram encontrados representantes das famílias Bovis, EAI, CAS e Afri que são consideradas mais ancestrais (FILLIOL *et al.*, 2002; FERDINAND *et al.*, 2004).

Quanto a estabilidade dos genótipos, os estudos indicaram que mais de 50% de todos os isolados cujos genótipos foram identificados no SpolDB4, estavam enquadrados em apenas seis SITs (17, 60, 42, 53, 50 e 1), indicando uma restrita diversidade genética. Borsuk *et al.* (2005) observaram no Sul do Brasil, cerca de metade dos isolados pertenciam a sete dos spoligotipos (SITs 17, 20, 33, 42, 50, 53 e 65). David *et al.* (2007), também verificaram na cidade de Lisboa, oito SITs responsáveis por 50% dos casos de tuberculose. A prevalência de 13,8%, 11,1% e 9,7%, respectivamente dos SITs 53, 50 e 42 é justificável uma vez que estes SITs são ubiqüitários, de ampla distribuição mundial (SOLA *et al.*, 2001). Para Malaspina *et al.* (2008), a ST53 é o

segundo isolado mais freqüentemente no SpolDB4, sugerindo ser um isolado de fácil transmissão e adaptabilidade. Os SITs 17 e 60, também são de ampla distribuição mundial, entretanto predominando nos países da América Latina (SOLA *et al.*, 2001; FILLIOL *et al.*, 2002). Em outro estudo realizado com 65 pacientes do Rio Grande do Sul, os dois padrões mais freqüentemente encontrados foram ST50 e ST53, que mostram uma freqüência alta em estudos anteriores realizados na América Latina (BORSUK *et al.*, 2005).

Quanto à localização geográfica dos demais SITs encontrados, pode-se observar que da família LAM, o spoligotipo 1895 (ST1895) é um tipo localizado, sendo descrito apenas no Brasil e o SIT 828, apenas no Brasil e no Guiné Bissau. Já os spoligotipos ST33, ST93 e ST1154 ainda não apresentaram relatos de ocorrência no Brasil. O SIT 33 é um spoligotipo exclusivo da África do Sul, sendo a identificação de um isolado deste spoligotipo neste trabalho, justificada pela presença de imigrantes da África do Sul na cidade de São Paulo. Fato curioso a ser destacado é que dentre os isolados com STs ainda não descritos no SpolDB4, SITVIT e Spotclust, dois isolados em *cluster* (23 e 82) apresentaram spoligotipo com 83% de similaridade com o SIT33, diferindo apenas pela ausência do espaçador 13. A presença do SIT 93, que é um tipo localizado na Venezuela, indica o possível contato de paulistanos com venezuelanos, bem como do SIT 1154, contato os haitianos. Na sub-família T1 os genótipos SITs 86, 102, 453, 1166, 1214 e 1475, bem como a SIT 34 da família S, ainda não foram descritos no Brasil, mas o fato de encontrar estes padrões entre os isolados da cidade de São Paulo não é surpresa uma vez que estes SITs são originários de países com estreita correlação de imigração com o Brasil (Venezuela, Argentina, Itália, Turquia, Portugal, etc). Dentro da mesma sub-família T1, ainda podemos destacar a presença de três isolados do genótipo raro SIT1905, com apenas 2 isolados no SpolDB4 sendo um do Brasil e outro da Argentina.

Na família X, o isolado clínico com SIT92, já foi identificado no Brasil. Entretanto, na família U com 5 isolados, os genótipos ST534 e ST560 nunca foram descritos na América do Sul. Destacamos também a presença, na cidade de São Paulo, de um spoligotipo raro, o SIT467 da sub-família H3 encontrados na Líbia e nos Estados Unidos, com descrição de apenas cinco isolados.

A técnica de *Spoligotyping* foi realizada em 93 isolados de *M. tuberculosis*, sendo identificados 12 *clusters* compreendendo de dois a 10 isolados cada, com similaridade de 100%. Segundo Cowan *et al.* (2005) do total de 259 isolados dos Estados Unidos, 64,1% formaram *cluster* pela técnica de *Spoligotyping*. Sharma *et al.* (2008), de 97 isolados de *M. tuberculosis* em área rural de Kanpur mostrou similaridade em 10 grupos clonais, responsável pela transmissão da doença nesta área.

Apesar de seis SITs representarem mais de 50% de todos os spoligotipos identificados na cidade de São Paulo, os demais SITs encontrados indicaram a grande diversidade genética dos isolados de *M. tuberculosis* presentes, caracterizados pela grande mistura étnica dos habitantes da cidade de São Paulo. Neste sentido, os nossos dados indicaram que esta técnica superestimou a formação de *clusters*, concordando com os dados de Borsuk *et al.* (2005) que também pesquisaram uma área com alta incidência de tuberculose no sul do Brasil (74,9/100.000). Os autores ainda sugeriram que a proporção alta de clones era devido à alta incidência de tuberculose. Por outro lado, dentre os 17 spoligotipos ainda não descritos no banco de dados SpolDB4 e SITVIT, a análise pelo Spotclust revelou que 9 STs apresentavam genótipo com 99% de similaridade com alguma sub-família já descrita, sendo STs 2, 7 e 17 com LAM9, ST3 com a LAM3, STs 9, 10 e 14 com a T1, o ST11 com a T4 e o ST16 com a H1. A análise dos quatro isolados do ST1 (5, 46, 110 e 183) em *cluster*, pelo Spotclust indicou que o genótipo destes eram similares em 11% com a sub-família T1, 39% com a H3 e 48% com

a H37Rv. A análise do dendrograma indicou que o spoligotipo destes isolados eram similaridade em 93% com o do SIT 50 da sub-família H3, diferindo deste pela ausência dos espaçadores 20 e 21. Entretanto se analisarmos o spoligotipo do H37Rv (7777777477760771), os genótipos dos quatro isolados é mais próximo do da cepa padrão diferindo apenas pela ausência do espaçador 29. O ST3 com dois isolados (23 e 82) em *cluster*, eram similares em 99% com a LAM3 no Spotclust. No dendrograma, ao ser analisado com os isolados deste estudo, a similaridade foi de 87% com o SIT 33 da sub-família LAM3, diferindo deste apenas em dois espaçadores (ausência do 13 e presença do 15).

Segundo Oelemann *et al.* (2007) e Cowan *et al.* (2005), a técnica de *Spoligotyping* deve ser utilizada com outros métodos de tipagem para identificar cadeia de transmissão e discriminar isolados em nível clonal. No Brasil, publicações tem sido verificadas associando *Spoligotyping* com RFLP-IS6110 (MALASPINA, 2008; BORSUK *et al.*, 2005; MARCHETTI *et al.*, 1997). Recentemente, a combinação de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR tem sido proposta como um novo padrão molecular para estudos epidemiológicos (HONISCH *et al.*, 2010), também realizado no Brasil por Supply *et al.* (2003), apesar do alto grau de conservação de MIRUs, entre os isolados clínicos de *M. tuberculosis*, 12 dos 24 *loci*, gera polimorfismo suficiente para investigação epidemiológica. Com potencial de acima de 16 milhões de combinação, a técnica de MIRU possui um poder de resolução semelhante ao do padrão ouro RFLP (MAZARS *et al.*, 2001).

Para Sola *et al.* (2001), há uma hierarquia de polimorfismo nestes doze *loci*, sendo os *loci* 10, 23, 26, 31 e 40 os que geram maior diversidade alélica. Concordando com os autores, no nosso estudo, os *loci* 10, 23, 26, e 40 foram os mais discriminatórios, entretanto no *locus* 31, a maior variação foi de 5 alelos para um isolado e 4 para 2

isolados e nos demais isolados a variação foi de 3 a 1 alelos. Analisando 259 isolados clínicos de *M. tuberculosis*, Cowan *et al.* (2005), obtiveram pela técnica de *Spoligotyping* a formação de 64,1% de isolados em *cluster* e de 46,7%, pela técnica de MIRU. Em nosso estudo, pela técnica de MIRU, todos os 93 isolados geraram genótipos independentes, não havendo a formação de grupos genéticos com 100% de similaridade. Segundo Mazars *et al.* (2001), os VNTR (minisatelites) são livres de pressão seletiva ou funcional sendo que os perfis de MIRU podem ser estáveis em isolamentos consecutivos até por 18 meses. Neste sentido, os dados mostram claramente o viés do nosso trabalho, que apesar de ter acompanhado por dois anos e estudado 93 isolados, esta amostragem foi pequena frente à alta incidência de tuberculose da cidade de São Paulo. Entretanto, Sharma *et al.* (2008) também não verificaram pela técnica de MIRU, formação de grupo genético nos isolados da zona rural de Kanpur, sul da Ásia. Os autores afirmaram que mesmo em pequenas populações, os isolados de *M. tuberculosis* podem apresentar uma grande diversidade genética.

Empregando a bioinformática, Ferdinand *et al.* (2004) verificaram que o *locus* 24 de MIRU permitem classificar as famílias de *Spoligotyping* em 2 grupos (A e B). As famílias Haarlem, T, X, LAM e Beijing apresentam no *locus* 24 números de alelos que variam de 0 a 1, pertencendo ao grupo B. Estas famílias são de evolução mais recente. As famílias Bovis, Afri, EAI pertencem ao grupo A, pois apresentam 2 ou 3 alelos no *locus* 24, e representam as famílias ancestrais. No nosso estudo, concordando com o relato de Ferdinand *et al.* (2004), todos os isolados apresentaram 0 ou 1 alelo no *locus* 24, e nenhum isolado foi encontrado como pertencente as famílias Bovis, Afri ou EAI. Os isolados encontrados na cidade de São Paulo são, portanto pertencentes às famílias que evoluíram mais recentemente e que aparentemente são mais prevalentes ao redor do mundo.

A associação das duas técnicas *Spoligotyping* e MIRU separou todos os isolados dos 12 grupos que haviam sido formados na técnica *Spoligotyping*, gerando 93 genótipos diferentes. Estes dados evidenciaram mais uma vez a alta diversidade genética encontrada entre os isolados de São Paulo. Entretanto, todos os isolados que formaram *cluster* pela técnica de *Spoligotyping*, quando associados com o MIRU, continuaram agrupados com uma similaridade de no mínimo 91%, havendo inclusive diferença de similaridade entre os isolados do mesmo *cluster*.

Um estudo realizado de 353 pacientes do Rio de Janeiro por Baptista em 2006, revelou que a combinação de MIRU-VNTR e *Spoligotyping* para a definição dos genótipos reduziu o número de *clusters* para 7,8% e os dados obtidos que sugeriram que os *clusters* formados por RFLP-IS6110 foram respeitados por MIRU. Segundo Silva *et al.* (2009), *Spoligotyping* apresentou o menor poder discriminatório, identificando 26 perfis entre os 65 isolados contra 46 MIRU demonstrando um poder discriminatório superior ao *Spoligotyping*.

Apesar do pequeno número de isolados em cada *cluster* de *Spoligotyping*, é possível verificar que para a discriminação de cada SIT e sub-família, determinados *loci* de MIRU foram mais discriminatórios. Ferdinand *et al.* (2004) verificaram que o *locus* 40 de MIRU era o mais discriminante para as famílias LAM, T, EAI e X, o MIRU 26 para Beijing e MIRU 23 para Haarlem. Observando especificamente para os 12 SITs em clone (quadro 13) os nossos resultados são concordantes com do Ferdinand *et al.* (2004) com relação ao T1 (*locus* 40) e Beijing (*locus* 26 para SIT 1). Entretanto para os SITs 60 e 828 (LAM 04), 42 (LAM 09), 17 (LAM 02) o *locus* 23 foi o mais promissor e não o 40, bem como para a o SIT 50 da família Haarlem, foi o *locus* 10 e não o 23.

Os MIRUs *loci* 10, 23, 26 e 40, foram os mais discriminatórios, sendo que os *loci* 26 e 40 foram os mais polimórficos com até 8 alelos, seguido dos *loci* 23 e 10 com

até 7 alelos. Em todos os isolados analisados, no *locus* 24 foi verificado apenas alelos 0 ou 1. Concordando com o nosso trabalho, o estudo realizado no Rio Grande do Sul, os *loci* 10, 23, 26 e 40 mostraram maior poder discriminatório (SILVA *et al.*, 2009).

Nos isolados 109 e 110 não foi possível a amplificação do MIRU *locus* 23 e no isolado 60 o MIRU *locus* 40, mesmo após 5 repetições. Em outro estudo realizado em nosso laboratório, segundo Santos (2009), 4 amostras não amplificaram os mesmos alelos de MIRU.

Ainda pode-se verificar pelo quadro 14 que o genótipo das cepas da família Beijing apresentou característica de MDR com exceção do isolado 65, resistente apenas a estreptomicina. Para Morcillo *et al.* (2005), as cepas Beijing podem geneticamente ser mais invasivas e mais propensas para adquirir resistência aos fármacos. Entretanto, neste estudo foi verificado que todas as famílias identificadas eram compostas de isolados MDR ou não, sem predominância de alguma família. Segundo Jardim *et al.* (2001), no Brasil a característica de MDR de *M. tuberculosis* em sua maioria são “adquiridas”, em consequência de falhas do tratamento, tais como a irregularidade, o abandono e prescrições inadequadas. Nossos dados concordam com os autores, indicando que na cidade de São Paulo os isolados clínicos adquiriram resistência aos quimioterápicos independente da família ou SIT a que *pertencem* e, que esta dependeu mais da pressão seletiva gerado pelas circunstâncias do que da propensão do micro-organismo em adquirir resistência.

6. Conclusões

A técnica *Spoligotyping* é fácil, rápida e permite uma visão ampla sobre a distribuição geográfica dos genótipos circulantes através da identificação de famílias e SITs.

A técnica de MIRU é mais minuciosa, com maior poder discriminatório.

Os isolados agrupados pela técnica de *Spoligotyping* em 12 *cluster* com 100% de similaridade, foram separados quando da associação com a técnica de MIRU. Mesmo assim, os isolados destes grupos clonais apresentaram similaridade de até 91%.

Cerca de 78% dos spoligotipos encontrados na cidade de São Paulo foram identificados no Banco Internacional de *Spoligotyping* SpolDB4 e SITVIT, sendo as famílias LAM, T e H as mais predominantes entre os isolados de São Paulo.

Os MIRUs *loci* 26, 40, 23 e 10, foram os mais discriminatórios, sendo que o *loci* 26 e 40 foram os mais polimórficos com até 8 alelos.

Cerca de 23% dos spoligotipos encontrados nos isolados do Ambulatório do Instituto Clemente Ferreira não compõem perfis descritos nos Bancos Internacionais de *Spoligotyping* SpolDB4, SITVIT e Spotclust.

Os SITs 50, 53 e 42 de distribuição ubiqüitária ao redor do mundo são também os mais freqüentes na cidade de São Paulo.

A presença de SITs localizados e ainda não identificados no Brasil como 33 (ZAF), 93 (VEN), 1154 (AUS, CZE, HIT, USA), 86 (AUT, ESP, FXX, GUF, ITA, ITAS, MDG, NLD, TUR, USA, VEN), 102 (RUS, USA, ZAF), 453 (GUF, PRT, SWE, USA), 1166 (MWI, USA VEN), 1214 (DEU, GUF, MDG, POL), 1475 (ARG, MWI, VEN), 65 (MTQ, SWE, USA), 175 (ARG, FXX, HTI, ITA, PER, SUR, USA), 157 (DEU, ITA, PRT), 467 (LBY, USA), 534 (ESP, GNB), 560 (GEO, RUS, USA) e 34 (ARG, ARM, AUT, AZE, BEL, CHN, CZE, DEU, ESP, EST, FIN, GBR, GLP, MOZ, MWI, NLD, NZL, PRT, REU, SAL, SWE, THA, USA, VEN, VNM, ZAF), retratam a grande diversidade genética dos isolados clínicos de *M. tuberculosis*, bem como a intensa imigração e mobilidade étnica de população da megalópole que é a cidade de São Paulo.

Os isolados clínicos de *M. tuberculosis* adquiriram resistências aos quimioterápicos independentes das famílias ou de SITs a que pertenciam, indicando que o surgimento de isolados MDR não foi determinante característica genética destas micobactérias.

7. Referências Bibliográficas

A Cidade. [Internet]. Disponível em: <http://www.saopaulo.com.br/acidade.htm>, Acesso em: 10 mai 2010.

A World Free of tuberculose. [Internet]. Disponível em: <http://www.who.int/tb/en>
Acesso em: 22 fev 2010.

ALLIX-BÉGUEC, C.; FAUVILLE-DUFAUX, M.; SUPPLY, P. Three-year population-based evaluation of standardized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat typing of *M. tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n.4, p.1398-1406, 2008.

BAPTISTA, I.M.F.D. **Avaliação da influência do tratamento diretamente observado (DOT) com e sem profilaxia na transmissão da tuberculose em centros médicos de saúde do município do Rio de Janeiro, utilizando técnicas de tipagem molecular em cepas de *M. tuberculosis***. 2006. 156f. Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, M.M.; MADEIRA, S.G.; LIMA, C.; BOFFO, M.; MATTOS, I.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTIN O. A. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. **Microbes Infect.**, n.7, p. 1338–1344, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5. ed. Rio de Janeiro:

FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J.R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W.M.; GORI, A.; ALHAJOJ, S.A.; ALLIX, C.; ARISTIMUÑO, L.; ARORA, J.; BAUMANIS, V. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international Spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiol.**, v. 6, p. 6-23, 2006.

CONDE, M.B.; MELO, F.A.F.; MARQUES, A.M.C.; CARDOSO, N.C.; PINHEIRO, V.G.F.; DALCIN, P.T.R III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis **J. Bras. Pneumol.**, v. 10, n. 35, p. 1018-1048, 2009.

COWAN, L.A.; MOSHER, L.; DIEM, L.; MASSEY, J.P.; CRAWFORD, J.T. Variable-Number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 1592-1602, 2002.

COWAN, L.S.; DIEM, L.; MONSON, T.; WAND, P.; TEMPORADO, D.; OEMIG, T.V.; CRAWFORD, J.T. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 688-695, 2005.

CUNHA, E.A.T.; MARQUES, M.; LEITE, C.Q.F.; JUNQUEIRA, C.T.; ARÃO, C.A.B.; COSTA, P. I. Contribuição do LACEN-MS no diagnóstico da tuberculose e da

resistência às drogas antituberculosas em Mato Grosso do Sul. **RBAC**, v. 41, n. 3, p. 191-196, 2009.

DALE, J.W.; BRITTAIN, D.; CATALDI, A.A.; COUSINS, D.; CRAWFORD, J.T.; DRISCOLL, J.; HEIRSMA, H.; LILLEBAEK, T.; QUITUGUA, T.; RASTOGI, N. Spacer oignonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*: recommendations for standardized nomenclature. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 5, p. 216-219, 2001.

DAVID, S.; PORTUGAL, CLARA.; ANTUNES, A.; CARDOSO, A.; CALADO, A., BARROS, V.; SANCHOS, L. Molecular identification using *Spoligotyping* of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from the Hospital Fernando Fonseca. **Rev. Port. Pneumol.**, v. 3, p. 193-204, 2004.

DAVID, S. RIBEIRO, D.R.; ANTUNES, A.; PORTUGAL, C.; SANCHO, L.; SOUSA, J.G. Contribution of spoligotyping to the characterization of the popular structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. **Infect. Genet. Evol.**, n. 7, p. 609-617, 2007.

EDWARDS, D.; KIRKPATRICK, C. H. The immunology of mycobacterial diseases. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 134, p. 1062-1071, 1986.

FARNIA, P.; MASJEDI, A.R.; VARAHRAM, M.; MIRSAEIDI, M.; AHMADI, M.; KHAZAMPOUR, M.; TABARSI, P.; BAGHEI, P.; MARJANE, M.; BAHADORI, M.; ZARIFI, A.Z.; VELAYATI. A.A. The Recent-Transmission of *Mycobacterium*

tuberculosis Strains among Iranian and Afghan Relapse Cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and *Spoligotyping*. **BMC Infect. Dis.**, v. 8, n. 109, p. 346–352 2008.

FERDINAND, S.; VALÉTUDIE, G.; SOLA, C.; RASTOGI. Data mining of *Mycobacterium tuberculosis* complex genotyping results using mycobacterial interspersed repetitive units validates the clonal structure of spoligotyping-defined families. **Res. Microbiol.**, n. 155, p. 647–654, 2004.

FERRAZOLI, L.; PALACI, M.; MARQUES, L. R. M.; JAMAL, L. F.; AFIUNE. J. B.; CHIMARA, E.; MARTINS, M. C. TELLES, 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.** v. 4, n. 1, p. 18-21, 2000.

FILLIOL, I.; DRISCOLL, J.R.; van SOOLINGEN, D.; KREISWIRTH, B.N.; KREMER, K.; VALÉTUDIE, G.; ANH, D.D.; BARLOW, R.; BANERJEE, D. *et al.* Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 11, p. 1347-1349, 2002.

FILLIOL, I.; DRISCOLL, J.R.; van SOOLINGEN, D.; KREISWIRTH, B.N.; KREMER, K.; VALÉTUDIE, G.; DANG, D.A.; BARLOW, R.; BANERJEE, D.; BIFANI, P.J. *et al.* Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 1963-1970, 2003.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **Am. J. Epidemiol.**, v. 153, p. 1135-1141, 2001.

GLYNN, J.R.; WHITELEY, J.; BIFANI, P.J.; KREMER, K.; van SOOLINGEN, D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 8, p. 843-849, 2002.

GROENEN, P.M.A.; BUNSCHOTN, A.E.; van SOOLINGEN, D.; van EMBDEN, J.D.A. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*: Application of strain differentiation by a novel method. **Mol. Microbiol.**, v. 10, n. 5, p. 1057-1065, 1993.

HIRATA, M. H.; MAMIZUKA, E.M.; HIRATA, R.D.C.; LEITE, A.Q.F. Técnicas de amplificação de gene para o diagnóstico da tuberculose. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 1, n. 18, p. 15-85, 1997.

HONISCHI, C.; MOSKO, M.; ARNOLD, C.; GHARBIA, S.E.; DIEL, R.; NIEMANN, S. Replacing Reverse Line-Blot Hybridization *Spoligotyping* of the *Mycobacterium Tuberculosis* Complex. **J. Clin. Microbiol.**, 2010. In Press. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/JCM.02299-09v1>.

JARDIM, P. C. R.; ZAMARIOLI, L. A.; COELHO, A. G. V.; FIGUEIREDO, T. R.; ROZMAN, M. A. Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas no município de São Vicente. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 119-123, 2001.

KAMERBEEK J.; SCHOULS L.; KOLK A.; VAN AGTERVELD M.; van SOOLINGEN D.; KUIJPER S.; BUNSCHOTEN A.; MOLHUIZEN H; SHAW R.; GOYAL M.; van EMBDEN J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 4, p. 907-914, 1997.

KANDUMA, E.; MCHUGH, T.D.; GILLESPIE, S.H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user's guide. **J. App. Microbiol.**, v. 94. p. 781-91, 2003.

KLAUTAU, G.B.; KUSCHNAROFF, T.M. Clinical Forms and Outcome of Tuberculosis in HIV-Infected Patients in a Tertiary Hospital in São Paulo – Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 6, p. 464-478, 2005.

KLATSER, P.R; KUIJPER, S.; van INGEN, C.W.; KOLK, A.H.J. Stabilized, Freeze-Dried PCR Mix for Detection of Mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 6, p. 1798-1800, 1998.

KREMER, K.; van SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W.H.; HERMANS, P.W.M.; MARTIN, 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 *M. tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2607-2618, 1999.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M.B.; SOUZA, G.R.M. **Tuberculose:** do ambulatório à enfermaria. 2. ed., São Paulo: Atheneu, 2000.

KWARA, A.; SCHIRO, R.; COWAN, L.S.; HYSLOP, N.E.; WISER, M.F.; HARRISON, S.R.; KISSINGER, P.; DIEM, L.; CRAWFORD, J.T. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 06, p. 2683-2685, 2003.

LEITE, C.Q.F. & SATO, D.N. *Mycobacterium* In: Silva, C.H.P.M. & Neufeld, P.M. (Ed.) **Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. p. 317-333.

MALAGHINI, M.; BROCKELT, S.R.; BURGER, M.; KRITSKI, A.; TOMAZ-SOCCOL, V. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the State of Parana in southern Brazil. **Tuberculosis**, v. 89, n. 1, p. 101-105, 2009.

MANJUBA, C.; NOGUEIRA, P.A.; ABRAHÃO, R.M.C.M. A situação epidemiológica da tuberculose na República da Guiné-Bissau, 2000 – 2005. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 11, n. 1, 2008.

MALASPINA, A.C.; CAVALCANTI, H.R.; LEITE, C.Q.; MACHADO, S.M.; VIANA, B.H.; SILVA, R.M.; HAGE, E.F.; FIGUEIREDO, W.M.; MARQUES, E.; FERRAZOLLI, L.; ARBEX, M.; LESSI, M.; FONSECA, L.S.; RIGOUTS, L.; SAAD, M.H. Usefulness of *Mycobacterium tuberculosis* Molecular Typing in a Tuberculosis Low-Endemic Agro-Industrial Setting of Brazil. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 61, p. 231-233, 2008.

MALASPINA, A. C. **Estudo da epidemiologia molecular da tuberculose em pacientes de Araraquara-SP no período de 2000 a 2002.** 2004 69 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

MARCHETTI, G.; GORI, A.; CATOZZI, L.; ROSSI, M.C.; MORONI, M.; FRANZETTI, F. Comparison of spoligotyping and RFLP DNA fingerprinting analysis in *M. tuberculosis* epidemiological typing. 1997. In: CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS, 5th, 1997, San Francisco. **Meeting...** Abstracts. n. 645, 1997.

MARQUES, A.M. & CUNHA, R.V. Assisted treatment and tuberculosis cure and treatment dropout rates in the Guaraní-Kaiwá Indian nation in the municipality of Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Cad. Saude Publica.**, v. 19, n. 5, 2003.

MAZARS, E.; LESJEAN; BANULS, A.L.; GILBERT, M.; VINCENT. V.; GICQUEL, B.; TIBAYRENC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **PNAS.**, v. 98, n. 4, p. 1901-1906, 2001.

MELO, F.A.M.; AFIUNE, J. B.; NETO, J.I.; ALMEIDA, E.A.A.; SPADA, D.T.A.; ANTELMO, A.N.L.; CRUZ, M.L. Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 1, 2003.

MORCILLO, N., DI GIULIO, B., CHIRICO, C., KURIGER, A., DOLMANN, A., ALITO, A., ZUMÁRRAGA, M., van SOOLINGEN, D., KREMER, K., CATALDI, A.. Primera descripción del genotipo Beijing de *Mycobacterium tuberculosis* en la Argentina. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 37, n. 2, p. 92-95, 2005.

MORCILLO, N., ZUMÁRRAGA, M., IMPERIALE, B., DI GIULIO, B., CHIRICO, C., KURIGER, A., ALITO, A., KREMER, K., CATALDI, A. Transmisión de la tuberculosis por genotipos predominantes de *Mycobacterium tuberculosis* en la región Gran Buenos Aires Norte. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 39, n. 3, p. 145-150, 2007.

NOGUTI, E. N.; LEITE, C.Q.F.; MALASPINA, A.C.; SANTOS, A.C.B.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; MAMIZUKA, E. M.; CARSOSO, R. F. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from low endemic setting in south of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 2010. In Press.

OELEMANN, M.C.; FONTES, A.N.B.; PEREIRA, M.A.S.; BRAVIN, Y.; SILVA, G.; DEGRAVE, W.; CARVALHO, A.C.C.; BRITO, R.C.; KRITSKI, A.L.; SUFFYS, P.N. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in community health centers of Rio de Janeiro city, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 455-462, 2007.

PANDOLFI, J.R. **Otimização da técnica de MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) para o estudo epidemiológico de pacientes com tuberculose**. 2006. 84f. - Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista – Instituto de Química, 2006.

PANDOLFI, J.R.; MALASPINA, A.C.; SANTOS, A.C.B.; SUFFYS, P.N.; OELLEMANN, M.A.C.; VALENTINI, S.R.; LEITE, C.Q.F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 28, n. 3, p.251-257, 2007.

PARK, Y.K.; BAI, G.H.; KIM, S.J. Restriction length polymorphism analysis of *M. tuberculosis* isolated from countries in the Western Pacific Region. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 191-197, 2000.

SAHADEVAN, R.; NARAYANAN, S.; PARAMASIVAN, C.N.; PRABHAKAR, R.; NARAYANAN, P.R. Restriction fragment length polymorfism typing of clinical isolates of *M. tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 3037-3039, 1995.

SANTOS, A.C.B. **Estudo da epidemiologia molecular da tuberculose em pacientes de Araraquara-SP, no período de 2002 à 2006.** 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

SAVINE, E.; WARREN, R.N.; van der SPUY, G.D.; BEYERS, N.; van HELDEN, P.D.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. Stability of variable-number tandem repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units from 12 loci in several Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n.12, p. 4561-4566, 2002.

SEQUERA, M.C.; DELGADO, V.S.; ARAQUE, M.W.; TORREALBA, M.O., NÚÑES, M.R.; MATA, O.J.; ABADIA, E.P.; TAKIFF, H.; WAARD, J. *Mycobacterium tuberculosis*: Espoligotipos em el estados Carabobo, Venezuela. **Rev. Chil. Infect.**, v. 25, n. 5, p. 362-367, 2008.

SEVERO, N.P.F.; LEITE, C.Q.F. Caracterização da população portadora de tuberculose no município de Américo Brasiliense no período de 1992 a 2002. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., Araraquara**, v. 26, n. 1, p. 83-86, 2005.

SHARMA, P.; CHAUHAN, D.S.; UPADHYAY, P.; FAUJDAR, J.; LAVANIA, M.; SACHAN, S.; KATOCH, K.; KATOCH, V.M. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a rural area of Kanpur by spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) typing. **Infect. Genet. Evol.**, v. 8, n.5, p. 621–626, 2008.

SILVA, A.B.S.; GROLL, A.V. FELIX, C.; CONCEIÇÃO, F.R.; SPIES, F.S.; SCAINI, C.J.; ROSSETTI, M.L.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O.A.; SILVA, P.E.A. Clonal diversity of *M. tuberculosis* isolated in a sea port city in Brazil. **Tuberculosis**, v. 89, p. 443-447, 2009.

SOLA, C.; FILLIOL, I.; GUTIERREZ, M.C.; MOKROUSOV, I.; VINCENT, V.; RASTOGI, N. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeografic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, n.3, p. 390-396, 2001.

SUN, J.-R.; LEE, S.-Y. DOU, H.-Y. LU, J.-J. Using a multiplex polymerase chain reaction for the identification of Beijing strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, n. 1, p. 105-107, 2008.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Mol. Microbiol.**, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

SUPPLY, P.; LESJEAN S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; van SOOLINGEN, D.; LOCHT, C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 10, p. 3563-3571, 2001.

SUPPLY, P.; WARREN, R.M; BAÑULS, A.L; LESJEAN, S.; van der SPUY, G.D.; LEWIS, L.A.; TIBAYRENC, M.; van HELDEN, P.D.; LOCHT, C.; Linkage disequilibrium between minisatellite *loci* supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. **Mol. Microbiol.**, v. 47, n. 2, p. 529–538, 2003.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 18, n. 6, p. 426-439, 1997.

Tuberculose em números. [Internet]. Disponível em:
http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_tb.html, Acesso em: 10 mai 2010.

van EMBDEN, J.D.A.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.D.; 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.**, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.

van SOOLINGEN, D.; DE 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.**, v. 31, p. 1987-1995, 1993.

van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; DE HAAS, P. E. W.; SOLL, D. R.; van EMBDEN, J. D. A. Occurrence and stability of insertion sequences in *M. tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 2578-2586, 1991.

van SOOLINGEN, D.; QIAN, L.; DE HAAS, P.E.; DOUG-LAS, J.T.; TRAORE, H.; PORTAELS, F.; QING, H.Z.; ENKHSAIKAN, D.; NYMADAWA, P.; van EMBDEN, J.D. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 12, p. 3234-3238, 1995.

VITOL, I.; DRISCOLL, J.; KREISWIRTH, B.; KUREPINA, N.; BENNETT, K.P.
Identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex strains families using spoligotypes.
Infect. Genet. Evol. v. 6. n. 6, p. 491-504, 2006.

YUEN, L.K.; ROSS, B.C.; JACKSON, K.M.; DWYER, B. Characterization of
Mycobacterium tuberculosis strain from Vietnamese patients by Southern blot
hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 6, p. 1615-1618, 1993.

8. Anexo

Ord.	País	2 Letras	3 Letras	Cód.
1	Afeganistão	AF	AFG	004
2	África do Sul	ZA	ZAF	710
3	Albânia	AL	ALB	008
4	Alemanha	DE	DEU	276
5	Algéria	DZ	DZA	012
6	Andorra	AD	AND	020
7	Angola	AO	AGO	024
8	Anguilla	AI	AIA	660
9	Antártida	AQ	ATA	010
10	Antígua e Barbuda	AG	ATG	028
11	Antilhas Holandesas	AN	ANT	530
12	Arábia Saudita	SA	SAU	682
13	Argentina	AR	ARG	032
14	Armênia	AM	ARM	51
15	Aruba	AW	ABW	533
16	Austrália	AU	AUS	036
17	Áustria	AT	AUT	040
18	Azerbaijão	AZ	AZE	31
19	Bahamas	BS	BHS	044
20	Bahrein	BH	BHR	048
21	Bangladesh	BD	BGD	050
22	Barbados	BB	BRB	052
23	Belarus	BY	BLR	112
24	Bélgica	BE	BEL	056
25	Belize	BZ	BLZ	084
26	Benin	BJ	BEN	204
27	Bermudas	BM	BMU	060
28	Bolívia	BO	BOL	068
29	Bósnia-Herzegovina	BA	BIH	070
30	Botsuana	BW	BWA	072
31	Brasil	BR	BRA	076
32	Brunei	BN	BRN	096
33	Bulgária	BG	BGR	100
34	Burkina Fasso	BF	BFA	854

35	Burundi	BI	BDI	108
36	Butão	BT	BTN	064
37	Cabo Verde	CV	CPV	132
38	Camarões	CM	CMR	120
39	Camboja	KH	KHM	116
40	Canadá	CA	CAN	124
41	Cazaquistão	KZ	KAZ	398
42	Chade	TD	TCD	148
43	Chile	CL	CHL	152
44	China	CN	CHN	156
45	Chipre	CY	CYP	196
46	Cingapura	SG	SGP	702
47	Colômbia	CO	COL	170
48	Congo	CG	COG	178
49	Coreia do Norte	KP	PRK	408
50	Coreia do Sul	KR	KOR	410
51	Costa do Marfim	CI	CIV	384
52	Costa Rica	CR	CRI	188
53	Croácia (Hrvatska)	HR	HRV	191
54	Cuba	CU	CUB	192
55	Dinamarca	DK	DNK	208
56	Djibuti	DJ	DJI	262
57	Dominica	DM	DMA	212
58	Egito	EG	EGY	818
59	El Salvador	SV	SLV	222
60	Emirados Árabes Unidos	AE	ARE	784
61	Equador	EC	ECU	218
62	Eritreia	ER	ERI	232
63	Eslováquia	SK	SVK	703
64	Eslovênia	SI	SVN	705
65	Espanha	ES	ESP	724
66	Estados Unidos	US	USA	840
67	Estônia	EE	EST	233
68	Etiópia	ET	ETH	231
69	Federação Russa	RU	RUS	643
70	Fiji	FJ	FJI	242
71	Filipinas	PH	PHL	608
72	Finlândia	FI	FIN	246

73	França	FR	FRA	250
74	França Metropolitana	FX	FXX	249
75	Gabão	GA	GAB	266
76	Gâmbia	GM	GMB	270
77	Gana	GH	GHA	288
78	Geórgia	GE	GEO	268
79	Gibraltar	GI	GIB	292
80	Grã-Bretanha (Reino Unido, UK)	GB	GBR	826
81	Granada	GD	GRD	308
82	Grécia	GR	GRC	300
83	Groelândia	GL	GRL	304
84	Guadalupe	GP	GLP	312
85	Guam (Território dos Estados Unidos)	GU	GUM	316
86	Guatemala	GT	GTM	320
87	Guiana	GY	GUY	328
88	Guiana Francesa	GF	GUF	254
89	Guiné	GN	GIN	324
90	Guiné Equatorial	GQ	GNQ	226
91	Guiné-Bissau	GW	GNB	624
92	Haiti	HT	HTI	332
93	Holanda	NL	NLD	528
94	Honduras	HN	HND	340
95	Hong Kong	HK	HKG	344
96	Hungria	HU	HUN	348
97	Iêmen	YE	YEM	887
98	Ilha Bouvet (Território da Noruega)	BV	BVT	074
99	Ilha Natal	CX	CXR	162
100	Ilha Pitcairn	PN	PCN	612
101	Ilha Reunião	RE	REU	638
102	Ilhas Cayman	KY	CYM	136
103	Ilhas Cocos	CC	CCK	166
104	Ilhas Comores	KM	COM	174
105	Ilhas Cook	CK	COK	184
106	Ilhas Faeroes	FO	FRO	234
107	Ilhas Falkland (Malvinas)	FK	FLK	238
108	Ilhas Geórgia do Sul e Sandwich do Sul	GS	SGS	239
109	Ilhas Heard e McDonald (Território da Austrália)	HM	HMD	334
110	Ilhas Marianas do Norte	MP	MNP	580

111	Ilhas Marshall	MH	MHL	584
112	Ilhas Menores dos Estados Unidos	UM	UMI	581
113	Ilhas Norfolk	NF	NFK	574
114	Ilhas Seychelles	SC	SYC	690
115	Ilhas Solomão	SB	SLB	090
116	Ilhas Svalbard e Jan Mayen	SJ	SJM	744
117	Ilhas Tokelau	TK	TKL	772
118	Ilhas Turks e Caicos	TC	TCA	796
119	Ilhas Virgens (Estados Unidos)	VI	VIR	850
120	Ilhas Virgens (Inglaterra)	VG	VGB	092
121	Ilhas Wallis e Futuna	WF	WLF	876
122	Índia	IN	IND	356
123	Indonésia	ID	IDN	360
124	Irã	IR	IRN	364
125	Iraque	IQ	IRQ	368
126	Irlanda	IE	IRL	372
127	Islândia	IS	ISL	352
128	Israel	IL	ISR	376
129	Itália	IT	ITA	380
130	Iugoslávia	YU	YUG	891
131	Jamaica	JM	JAM	388
132	Japão	JP	JPN	392
133	Jordânia	JO	JOR	400
134	Kênia	KE	KEN	404
135	Kiribati	KI	KIR	296
136	Kuait	KW	KWT	414
137	Laos	LA	LAO	418
138	Látvia	LV	LVA	428
139	Lesoto	LS	LSO	426
140	Líbano	LB	LBN	422
141	Libéria	LR	LBR	430
142	Líbia	LY	LBY	434
143	Liechtenstein	LI	LIE	438
144	Lituânia	LT	LTU	440
145	Luxemburgo	LU	LUX	442
146	Macau	MO	MAC	446
147	Macedônia	MK	MKD	807
148	Madagascar	MG	MDG	450

149	Malásia	MY	MYS	458
150	Malauí	MW	MWI	454
151	Maldivas	MV	MDV	462
152	Mali	ML	MLI	466
153	Malta	MT	MLT	470
154	Marrocos	MA	MAR	504
155	Martinica	MQ	MTQ	474
156	Maurício	MU	MUS	480
157	Mauritânia	MR	MRT	478
158	Mayotte	YT	MYT	175
159	México	MX	MEX	484
160	Micronésia	FM	FSM	583
161	Moçambique	MZ	MOZ	508
162	Moldova	MD	MDA	498
163	Mônaco	MC	MCO	492
164	Mongólia	MN	MNG	496
165	Montserrat	MS	MSR	500
166	Myanma	MM	MMR	104
167	Namíbia	NA	NAM	516
168	Nauru	NR	NRU	520
169	Nepal	NP	NPL	524
170	Nicarágua	NI	NIC	558
171	Níger	NE	NER	562
172	Nigéria	NG	NGA	566
173	Niue	NU	NIU	570
174	Noruega	NO	NOR	578
175	Nova Caledônia	NC	NCL	540
176	Nova Zelândia	NZ	NZL	554
177	Omã	OM	OMN	512
178	Palau	PW	PLW	585
179	Panamá	PA	PAN	591
180	Papua-Nova Guiné	PG	PNG	598
181	Paquistão	PK	PAK	586
182	Paraguai	PY	PRY	600
183	Peru	PE	PER	604
184	Polinésia Francesa	PF	PYF	258
185	Polónia	PL	POL	616
186	Porto Rico	PR	PRI	630

187	Portugal	PT	PRT	620
188	Qatar	QA	QAT	634
189	Quirguistão	KG	KGZ	417
190	República Centro-Africana	CF	CAF	140
191	República Dominicana	DO	DOM	214
192	República Tcheca	CZ	CZE	203
193	Romênia	RO	ROM	642
194	Ruanda	RW	RWA	646
195	Saara Ocidental	EH	ESH	732
196	Saint Vincente e Granadinas	VC	VCT	670
197	Samoa Ocidental	AS	ASM	016
198	Samoa Ocidental	WS	WSM	882
199	San Marino	SM	SMR	674
200	Santa Helena	SH	SHN	654
201	Santa Lúcia	LC	LCA	662
202	São Cristóvão e Névis	KN	KNA	659
203	São Tomé e Príncipe	ST	STP	678
204	Senegal	SN	SEN	686
205	Serra Leoa	SL	SLE	694
206	Síria	SY	SYR	760
207	Somália	SO	SOM	706
208	Sri Lanka	LK	LKA	144
209	St. Pierre and Miquelon	PM	SPM	666
210	Suazilândia	SZ	SWZ	748
211	Sudão	SD	SDN	736
212	Suécia	SE	SWE	752
213	Suíça	CH	CHE	756
214	Suriname	SR	SUR	740
215	Tadjiquistão	TJ	TJK	762
216	Tailândia	TH	THA	764
217	Taiwan	TW	TWN	158
218	Tanzânia	TZ	TZA	834
219	Território Britânico do Oceano Índico	IO	IOT	086
220	Territórios do Sul da França	TF	ATF	260
221	Timor Leste	TP	TMP	626
222	Togo	TG	TGO	768
223	Tonga	TO	TON	776
224	Trinidad and Tobago	TT	TTO	780

225	Tunísia	TN	TUN	788
226	Turcomenistão	TM	TKM	795
227	Turquia	TR	TUR	792
228	Tuvalu	TV	TUV	798
229	Ucrânia	UA	UKR	804
230	Uganda	UG	UGA	800
231	Uruguai	UY	URY	858
232	Uzbequistão	UZ	UZB	860
233	Vanuatu	VU	VUT	548
234	Vaticano	VA	VAT	336
235	Venezuela	VE	VEN	862
236	Vietnã	VN	VNM	704
237	Zaire	ZR	ZAR	180
238	Zâmbia	ZM	ZMB	894
239	Zimbábue	ZW	ZWE	716

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)