UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

SHARA RODRIGUES DA SILVA

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MIRU-VNTR PARA CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DA CEPA PADRÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

DOURADOS, ABRIL, 2013

SHARA RODRIGUES DA SILVA

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MIRU-VNTR PARA CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DA CEPA PADRÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO, APRESENTADO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE BIOTECNÓLOGO NO CURSO DE BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS. ORIENTADOR: PROF. JÚLIO HENRIQUE ROSA CRODA

DOURADOS, ABRIL, 2013

Bendito sejas, ó Senhor, Deus de Israel, nosso pai, de eternidade a eternidade.

Teus, ó Senhor, são a grandeza, o poder, a glória, a majestade e o esplendor, pois tudo o que há nos céus e na terra é teu.

Teu, ó Senhor, é o reino, tu estás acima de tudo.

A riqueza e a honra vêm de ti; tu dominas sobre todas as coisas.

Nas tuas mãos estão a força e o poder para exaltar e dar força a todos.

Agora, nosso Deus, damos-te graças, e louvamos o teu glorioso nome.

Tudo vem de ti, e nós apenas te damos o que vem das tuas mãos.

1 Crônicas 29:10-14

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos iniciais são dedicados ao Senhor Jesus, por que Dele e por Ele e para Ele são todas as coisas, glória pois a Ele eternamente Rm 11:36, reconheço que somente por sua soberana graça, mais esta etapa se concretiza.

Agradecimentos especiais ofereço a minha querida mãe que por meio de seu amor é meu apoio constante. Aos meus familiares que fazem parte desta conquista.

Agradeço aos professores do curso de Biotecnologia que foram meus parceiros ao longo desta jornada contribuindo de maneira relevante na formação de meu caráter profissional.

Ao professor Júlio Henrique Rosa Croda pela orientação, a professora Simone Simionatto pela coorientação e a Flávia Patussi Correia Sacchi por todo o auxílio prestado ao longo deste trabalho.

Meu profundo agradecimento a todos os meus amigos, irmãos de fé, colegas, professores, técnicos, enfim tantos que não posso mencionar e que constituem detalhes importantes para mais esta realização em minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....7

INTRODUÇÃO.....8

MÉTODOS.....9

Cultivo da Cepa de Referência.....9

Extração do DNA.....10

MIRU-VNTR.....11

Eletroforese em gel de agarose e análise dosresultados.....11

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....11

CONCLUSÃO 14

REFERÊNCIAS.....14

ARTIGO

Padronização da técnica MIRU-VNTR para caracterização genotípica da cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis*

Shara Rodrigues da Silva[a], Júlio Henrique Rosa Croda[b], Simone Simionatto[a], Flávia Patussi Correia Sacchi[b]

[a]Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil. [b]Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.

Endereço para correspondência: Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados – Itaúm. Km 12, Dourados, Mato Grosso do Sul 79804-970, Brasil Tel.: +55 67 3410-2190; E-mail sharabiotec@gmail.com

Preparado de acordo com as normas da Revista de Medicina Tropical

Padronização da técnica MIRU-VNTR para caracterização genotípica da cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis*

Shara Rodrigues da Silva[a], Júlio Henrique Rosa Croda[b], Simone Simionatto[a], Flávia Patussi Correia Sacchi[b]

[a]Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.
[b]Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.

Endereço para correspondência: Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados – Itaúm. Km 12, Dourados, Mato Grosso do Sul 79804-970, Brasil Tel.: +55 67 3410-2190; E-mail sharabiotec@gmail.com

RESUMO

A técnica de genotipagem *Variable Number of Tandem Repeats of Mycobacterial Intersperced Repetitive Units* (MIRU-VNTR) é promissora em estudos de epidemiologia. O objetivo deste trabalho é realizar a padronização da técnica MIRU-VNTR para caracterização genotípica de cepas de *M. tuberculosis*, para as condições oferecidas no laboratório da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados. O protocolo utilizado como referência foi o descrito por De Beer e Kremer. A cepa utilizada de *M. tuberculosis* padrão de referência H37Rv, foi cultivada em meio de cultura *Ogawa-Kudoh* e mantida em Meio de Sauton com glicerol 10%, armazenada em criotubos a -70ºC. A extração de DNA genômico de *M. tuberculosis* foi realizada com o Kit comercial QIAamp. O DNA genômico extraído foi utilizado na amplificação de regiões específicas com auxílio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se 24 pares de *primers*. As condições de amplificação foram constituídas de uma fase inicial a 95°C por 15 min e 30 ciclos de 95°C por 1 min, 59°C por 1 min e 72°C por 1 min e 30s com extensão final a 72°C por 10 min. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% corados com Sybr Safe Dna Gel Stain. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com marcadores de peso molecular de 50-pb e 100-pb e o número de cópia MIRU por locus foi calculada através do padrão de bandas das imagens geradas por eletroforese. Os resultados obtidos demonstraram que objetivo do trabalho foi alcançado, pois cada loci da cepa H37Rv apresentou o tamanho e número de pares de base correspondentes aos descritos na literatura, mostrando que esta técnica reprodutível foi padronizada para as condições encontradas neste laboratório, sem maiores dificuldades.

Palavras-chaves: Tuberculose, Epidemiologia molecular, Genotipagem

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa grave causada por micobactérias que