

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**

PAULO CÉSAR PEREIRA DOS SANTOS

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MOLECULAR RFLP-IS6110 PARA ESTUDOS
EPIDEMIOLÓGICOS DA TUBERCULOSE EM MATO GROSSO DO SUL**

Dourados, Mato Grosso do Sul
2016

PAULO CÉSAR PEREIRA DOS SANTOS

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MOLECULAR RFLP-IS6110 PARA ESTUDOS
EPIDEMIOLÓGICOS DA TUBERCULOSE EM MATO GROSSO DO SUL**

Relatório final, apresentado a Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências para a obtenção do título em Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Julio Henrique Rosa Croda

Dourados, 30 de setembro de 2016

Dourados – MS
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237p Santos, Paulo Cesar Pereira Dos

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MOLECULAR RFLP-IS6110 PARA
ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DA TUBERCULOSE EM MATO GROSSO
DO SUL / Paulo Cesar Pereira Dos Santos -- Dourados: UFGD, 2016.

19f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Julio Henrique Rosa Croda

TCC (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências
Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. M. tuberculosis. 2. Tipagem molecular. 3. Epidemiologia. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MOLECULAR RFLP-IS6110 PARA ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DA TUBERCULOSE EM MATO GROSSO DO SUL

Resumo

A tuberculose (TB) é uma doença de grande importância para a saúde global que causa milhões de mortes de pessoas a cada ano. Em 2015, a taxa de incidência a cada 100 mil habitantes foi de 28,4 em Mato Grosso do Sul e 39,4 em Dourados. Através de ferramentas moleculares torna-se possível caracterizar e identificar linhagens do *Mycobacterium tuberculosis* que auxiliará na elaboração de medidas de controle da doença. A técnica de RFLP-IS6110, quando comparada com outras ferramentas moleculares, é considerada padrão-ouro por conta de seu alto poder discriminatório para esses estudos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi padronizar a técnica RFLP-IS6110 para estudos epidemiológicos da tuberculose a fim de identificar as características genotípicas das populações de *M. tuberculosis* em Mato Grosso do Sul. As cepas de *M. tuberculosis* foram isoladas das bacteriotecas do Laboratório Central e Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde e o protocolo original para a genotipagem das cepas foi adaptado para a sua utilização aqui no estado. O protocolo consistiu pelas etapas de digestão com a enzima de restrição *PvuII*, seguindo de eletroforese, transferência por *Southern blot*, hibridização e revelação colorimétrica. Os perfis genotípicos obtidos na membrana foram analisados utilizando o banco de dados RIVM–Bionumerics; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium. Diferentes padrões de bandas estavam presentes nas membranas, afirmando a clivagem dos fragmentos do IS6110. Entretanto, algumas bandas eram difíceis de serem identificadas, então, adaptações como aplicação de uma menor alíquota de amostra no gel e maior tempo de revelação foram adotados para uma melhor qualidade das membranas. Com isso, foi possível agrupar cepas com os mesmos perfis moleculares, formando *clusters* quando dois ou mais isolados apresentaram o mesmo perfil genotípico. Foi possível observar a importância da padronização e aplicação da técnica de RFLP-IS6110 para estudos epidemiológicos em tuberculose no estado de Mato Grosso do Sul, uma vez que é possível utilizá-la como uma ferramenta para melhor conhecer a dinâmica da doença aqui no estado.

Palavras-chave: *M. tuberculosis*. Tipagem molecular. Epidemiologia.

STANDARDIZATION OF THE MOLECULAR TECHNIQUE RFLP-IS6110 FOR EPIDEMIOLOGIC STUDIES OF TUBERCULOSIS IN MATO GROSSO DO SUL

Abstract

Tuberculosis (TB) is a disease of major importance to global health that causes millions of deaths annually. In 2015, the incidence rate per 100 thousand inhabitants was 28.4 in Mato Grosso do Sul and 39.4 in Dourados. Through molecular tools for epidemiological studies, it is possible to characterize and identify strains of *Mycobacterium tuberculosis*, assisting in the development of disease control measures. The RFLP-IS6110 technique, when compared with other molecular tools, it is considered gold standard because of its high discriminatory power for these studies. In this context, the aim of this study was to standardize the IS6110 RFLP technique for epidemiologic studies of tuberculosis to identify genotypic characteristics of *M. tuberculosis* populations in Mato Grosso do Sul. The *M. tuberculosis* strains were isolated from the Central Laboratory and Research Laboratory in Health Sciences' bacterial collections and the original protocol for genotyping strains was adapted for its use here in the state. The protocol consisted of digestion step with the restriction enzyme *PvuII*, followed by electrophoresis, Southern blot, hybridization and colorimetric revelation. Genotypic profiles obtained in the membrane were analysed using the RIVM-BioNumerics database; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium. Different patterns of bands were present in the membranes of IS6110 stating cleavage fragments. However, some bands were difficult to be identified, so adjustments such as applying a lower sample aliquot in the gel and longer revelation time were adopted for a better quality of the membranes. Thus, it was possible to group strains that had the same molecular profiles, forming *clusters* when two or more isolates showed the same genotypic profile. It was possible to observe the importance of standardization and application of RFLP-IS6110 technique for epidemiologic studies of tuberculosis in Mato Grosso do Sul since it is possible to use it as a tool for a better understanding of the disease dynamics in the state.

Key words: *M. tuberculosis*. Molecular typing. Epidemiology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 MATERIAL E MÉTODOS.....;	9
2.1 ISOLADOS DE <i>M. Tuberculosis</i>.....	9
2.2 DIGESTÃO DO DNA COM <i>PVUII</i> E ELETROFORESE.....	9
2.3 TRANSFERÊNCIA (<i>SOUTHERN BLOT</i>).....	9
2.4 HIBRIDIZAÇÃO.....	10
2.5 DETECÇÃO PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO.....	10
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PERFIS MOLECULARES.....	11
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
3.1 ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i>.....	11
3.2 QUALIDADE DAS MEMBRANAS.....	12
3.3 ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO.....	14
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	16
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* e de grande importância para a saúde global. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), essa enfermidade causa milhões de mortes a cada ano. Em 2014, foram notificados 9,6 milhões de casos novos de TB no mundo, sendo que 1,5 milhões desses casos resultaram em mortes decorrentes da doença (WHO, 2015).

O Brasil está na 18ª posição entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo, sendo responsável por 0,9% dos casos estimados mundialmente e 33% dos casos estimados para os países do continente americano (WHO, 2015). Em 2015, foram notificados no país 63.189 casos novos, com 30,9 e 2,2/100 mil habitantes como coeficientes de incidência e de mortalidade, respectivamente. No estado do Mato Grosso do Sul, a taxa de incidência a cada 100 mil habitantes é de 28,4, apresentando um coeficiente de 2,1 mortes a cada 100 mil pessoas (Brasil, 2016). Em Dourados, o coeficiente de incidência é de 39,4 e 3,0 de mortalidade por 100 mil habitantes (Brasil, 2014). Entretanto, em populações mais vulneráveis como população privada de liberdade (PPL) e indígenas, esse coeficiente de incidência atinge vinte e oito e três vezes maior, respectivamente (Baussano *et al.*, 2010; Brasil, 2015).

Com a finalidade de se caracterizar e identificar linhagens do *M. tuberculosis*, a epidemiologia molecular tem sido utilizada como um instrumento para um melhor entendimento dos mecanismos relacionados a identificação dos fatores de risco e a transmissão da doença em uma comunidade (Santos *et al.*, 2007). Além disso, as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para investigar propriedades biológicas das linhagens, como virulência e patogenicidade, e para detecção precoce de organismos que adquiriram resistência a antibióticos. Com isso, torna-se possível a elaboração de medidas de controle e intervenções mais efetivas (Levin *et al.*, 1999; Pandolf *et al.*, 2007).

O avanço das ferramentas para estudos epidemiológicos moleculares desde a década de 90 (Mathema *et al.*, 2006; Gillespie, 2007) contribuiu para uma maior identificação das características genotípicas das populações de *M. tuberculosis* (Lima *et al.*, 2013). Essas técnicas têm auxiliado na caracterização de isolados clínicos com base no polimorfismo genotípico do bacilo causador da tuberculose (DNA fingerprint) (Mathema *et al.*, 2006; Gillespie, 2007).

Dentre as técnicas de biologia molecular mais utilizadas para genotipagem de micobactérias estão: unidades repetitivas intercaladas de micobactérias (MIRU- *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*), a tipagem pelos oligonucleotídeos espaçadores (*Spoligotyping* -

Spacer oligonucleotide typing) e o Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição da sequência de inserção IS6110 (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Mathema *et al.*, 2006; Gillespie, 2007; Van Der Spuy *et al.*, 2009).

A técnica MIRU baseia-se na análise sistemática da amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de 12, 15 ou 24 lócus contendo números variáveis de repetições em tandem (VTRNs), através de primers específicos para cada lócus, diferindo em número de cópias entre os isolados presentes nas cepas de *M. tuberculosis* (Barnes e Cave, 2007). Essa técnica é considerada produtível, rápida e apresenta um poder discriminatório maior quando comparado com a técnica de *Spoligotyping* (Kremer, Arnold, *et al.*, 2005; Jonsson *et al.*, 2014). Entretanto, a técnica MIRU apresenta um poder discriminatório menor que o RFLP-IS6110 (Kremer, Au, *et al.*, 2005), apenas o igualando quando combinado com a utilização de outra técnica como o *Spoligotyping* (Bidovec-Stojkovic *et al.*, 2011)

Através do método *Spoligotyping*, estuda-se o polimorfismo presente na região do lócus de repetição direta (DR-*Direct Repeat*) de *M. tuberculosis* por meio de amplificação dessa região por PCR, baseando-se na presença ou ausência de 43 espaçadores específicos entre essas regiões DRs presentes nesse lócus (Kamerbeek *et al.*, 1997). Essa técnica apresenta vantagens por ser um método rápido e eficaz, que pode identificar cepas com menos de 6 cópias do IS6110, entretanto, quando não combinado com outro procedimento, apresenta um baixo poder discriminatório (Kanduma *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004).

O RFLP da sequência de inserção (IS) 6110 é considerado uma ferramenta molecular padrão-ouro para estudos epidemiológicos (Kanduma *et al.*, 2003). Através desse método, ocorre a digestão do DNA da bactéria por meio de enzimas de restrição, que geram fragmentos contendo diferentes comprimentos dessa sequência de inserção. Com isso, buscam-se as diferenças quanto ao número e posição desses fragmentos IS6110 encontrados dispersos no genoma do *M. tuberculosis* (Collins e De Lisle, 1984; Van Embden *et al.*, 1993; Patel *et al.*, 1996). Entretanto, a técnica é laboriosa e apresenta difícil análise dos resultados gerados (Mathema *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007). Por outro lado, ao utilizar essa metodologia, consegue-se um alto poder discriminatório para a distinção entre os perfis genotípicos das cepas, quando comparado aos outros métodos, servindo de uma ótima ferramenta para estudos epidemiológicos em tuberculose (Kremer *et al.*, 1999; Sahebi *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi padronizar a técnica RFLP-IS6110 para estudos epidemiológicos da tuberculose a fim de identificar as características genotípicas das populações de *M. tuberculosis* em Mato Grosso do Sul.

2 Material e Métodos

Baseado no protocolo proposto por Van Embden *et al.*, (1993), a padronização da técnica de RFLP- IS6110 foi realizada no Laboratório de Pesquisa de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados, localizada na cidade de Dourados, em Mato Grosso do Sul.

2.1 Isolados de *M. tuberculosis*

As cepas de micobactérias que foram utilizadas para a padronização do protocolo foram isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar notificados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) presentes nas bacteriotecas do Laboratório Central-MS (LACEN-MS) e do Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS). A cultura das cepas foi feita em meio Ogawa-Kudoh (Kudoh e Kudoh, 1974) e o DNA bacteriano foi extraído seguindo o método CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) (Van Embden *et al.*, 1993).

2.2 Digestão do DNA com *PvuII* e eletroforese

Em cada microtubo, foram acrescentados 5 µg de DNA da amostra, 3 µl de enzima *Pvu II* + tampão NE 1X 3.1 (1µl de enzima + 2 µl de tampão) e água de injeção, caso necessário, para se obter um volume final de 18 µl de amostra final. As amostras foram colocadas em banho-seco à 37°C por 3 horas. Em seguida, 4 µl de solução de arraste (Ficoll 400 Azul de Bromofenol, DSS) foram adicionados em cada tubo para interromper a reação. O total de quinze amostras foi aplicado em gel de agarose 1,0%, juntamente com três amostras da cepa padrão MT 14323. Adotou-se uma corrida eletroforética inicial de 5 minutos a 100 Volts e o restante do tempo (19 horas e 55 minutos) a 35 Volts. Entretanto, a corrente não tinha sido definida, logo padronizou-se a corrente de 200 Ampères, para a primeira corrida de 5 minutos, e 80 Ampères, para a segunda.

2.3 Transferência (*Southern blot*)

Uma membrana de nylon positivamente carregada (GE Healthcare) foi cortada com as dimensões de 19 cm por 19 cm, colocada em um recipiente de vidro para ser umedecida com água destilada, posteriormente desprezada, e, então, com solução de SSC 20X (NaCl 3.0 M, Na₃ citrate 2H₂O 0.3 M), também desprezada. O sistema de blotting a vácuo VacuGene XL (Amersham Biosciences) foi preparado na seguinte ordem: tela de suporte umidificada,

membrana de náilon, previamente tratada com água e solução SSC 20X, máscara plástica umedecida com água e, por fim, o gel contendo o DNA digerido. O equipamento de bomba do vácuo foi ligado e ajustado a uma pressão de 50 mbar. Cobriu-se o gel com aproximadamente 100 mL de solução de despurinação (HCl 0,2 M) durante 7 minutos, removendo-a logo em seguida. O mesmo procedimento foi feito utilizando solução desnaturante (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) e neutralizadora (Tris 1 M pH 8, NaCl 1,5 M). Por fim, cobriu-se o gel com a mesma quantidade (100 mL) com SSC 20X por 30 minutos para concluir a transferência. A seguir, o DNA foi fixado na membrana utilizando o equipamento para irradiação com luz ultravioleta (Stratalinker® UV 500 Crosslinker) a 1200 μ J por 12 segundos.

2.4 Hibridização

A membrana foi enrolada em si mesma, colocada dentro do tubo de hibridização e umedecida com 20 mL de tampão SSC 2X, posteriormente desprezado. Para a etapa de pré-hibridização, 10 mL do tampão de hibridização foi adicionado ao tubo contendo a membrana, e o mesmo incubado no forno de hibridização (HB-1D Techne Inc) a 42°C por 1 hora e meia. Para a etapa de hibridização, 50 μ L de sonda IS6110, previamente marcada utilizando o kit Roche (Dig DNA Labeling kit), foram adicionados em 10 mL de tampão de hibridização, sendo, desnaturada por 10 minutos em água fervente e colocada, posteriormente, em banho de gelo por 30 minutos. A solução que estava no tubo hibridização foi substituída pelo tampão de hibridização contendo a sonda marcada desnaturada. O tubo foi incubado por 18-20 horas a 42°C. O tampão de hibridização adicionado de sonda foi reutilizado por mais 3 vezes em outras membranas, sendo acondicionado a 20°C para posteriores reutilizações.

2.5 Detecção pelo método colorimétrico

A membrana foi lavada duas vezes, no próprio tubo de hibridização, com 50 mL de solução SSC 2X por 5 min, à temperatura ambiente, e, então, por mais duas vezes em 50 mL de solução SSC 0,5X por 15 min a 68°C. Posteriormente, a membrana foi incubada em 90 mL de tampão 2 (NaCl 150 mM, Ácido Maleico 100 mM, Solução Bloqueadora 10%) à 25°C por 30 minutos, sendo o tampão 2 desprezado logo após. Assim, 10 mL de Tampão 2, acrescido de 2 μ L do conjugado Anti-Digoxigenin-AP (Roche Diagnostics GmbH), foram adicionados ao tubo antes de ser incubado por mais 30 minutos a 25°C. A membrana, ainda no tubo, foi lavada duas vezes com 50 mL de tampão de lavagem por 15 min a 25°C. Feito isso, a membrana foi transferida para um recipiente de vidro e equilibrada com 20 mL de tampão 3 (Tris-base 100

mM, NaCl 100 mM) + MgCl₂ por 4-5 minutos. A solução foi desprezada, 20 mL de solução reveladora contendo NBT + X fosfato/BCPI (Roche Diagnostics GmbH) foram adicionados e a membrana foi então mantida em local escuro para a revelação, sendo checada a cada 30-60 minutos ou até que as bandas atingissem uma intensidade bem nítida. Para interromper a reação, a membrana foi lavada com tampão 3, para tornar as bandas mais nítidas, ou água.

2.6 Análise estatística dos perfis moleculares

Os perfis moleculares obtidos pela aplicação do RFLP-IS6110 foram analisados utilizando o banco de dados RIVM–Bionumerics; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium. Um *cluster* foi definido como um grupo de dois ou mais isolados de diferentes pacientes cujos padrões de RFLP foram idênticos no que diz respeito tanto ao número e peso molecular de todas as bandas. Isolados que tinham padrões únicos foram considerados com perfil único. Um dendrograma foi construído para demonstrar o arranjo de agrupamento obtido após a análise dos dados.

3 Resultados e Discussão

3.1 Isolados de *M. tuberculosis*

As membranas apresentaram amostras que continham bandas de diferentes pesos moleculares, certificando que os fragmentos do IS6110 foram clivados durante a etapa de digestão pela enzima *PvuII* assim como esperado, provando o isolamento de cepas de *M. tuberculosis* (Figura 1) (Van Embden *et al.*, 1993; Kanduma *et al.*, 2003).

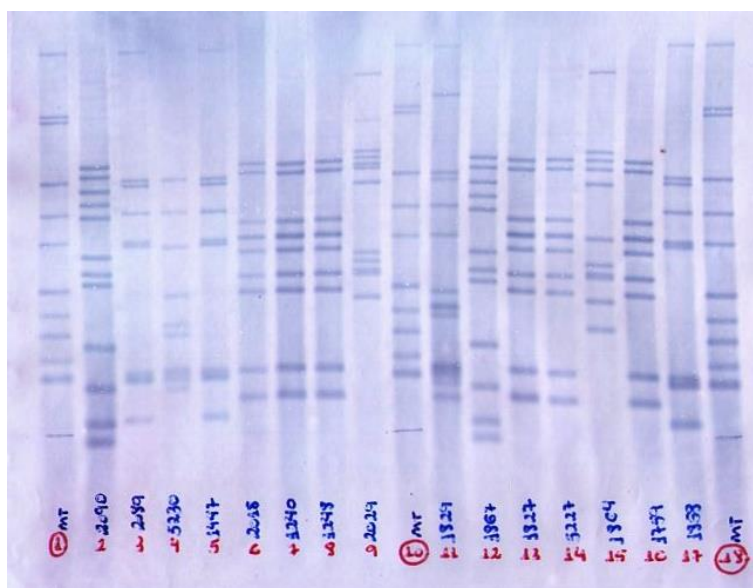


Figura 1. Membrana de nylon revelada pelo método colorimétrico evidenciando fragmentos *IS6110* e genótipos obtidos durante a padronização da técnica RFLP. Colunas 1, 10 e 18 - cepa de referência (MT 14323). Colunas 2 a 9 e 11 a 17 isolados estudados.

3.2 Qualidade das membranas

Algumas bandas presentes na membrana eram difíceis de serem identificadas, devido à sua baixa intensidade de nitidez, o que gerou incerteza sobre sua real presença ou não (Figura 2).

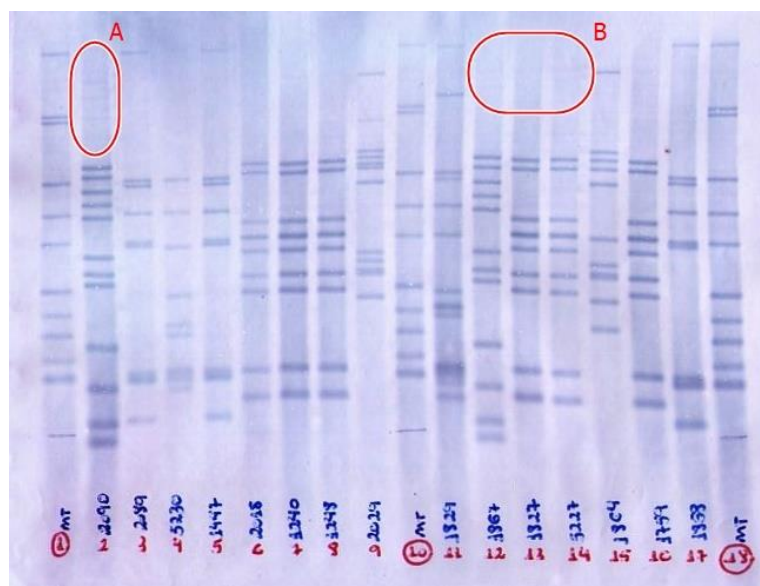


Figura 2. Membrana de nylon revelada pelo método colorimétrico evidenciando fragmentos *IS6110* e genótipos obtidos durante a padronização da técnica RFLP. Colunas 1, 10 e 18 - cepa de referência (MT 14323). Colunas 2 a 9 e 11 a 17 isolados estudados. **A** e **B** presença de bandas incertas.

Para isso, aplicou-se um tempo maior de revelação com o intuito de evidenciar ou não as bandas incertas. Quando persistentes, adotou-se possibilidade de marcar estas bandas incertas como presentes na membrana quando inseridas no software Bionumerics, decidindo, posteriormente, sua presença ou não após a comparação feita com a construção do dendrograma.

A presença de manchas na membrana também foi uma dificuldade para a análise das bandas (Figura 3). Com isso, experimentou-se adicionar uma alíquota menor de amostra (16

μl), que inicialmente era de $24\mu\text{l}$ no gel de agarose 1,0%, visto, também, que no momento da aplicação no gel, ocorria o transbordamento nos poços. Consequentemente, obteve-se uma melhora na qualidade das bandas na membrana e, logo, uma análise mais precisa (Figura 4).

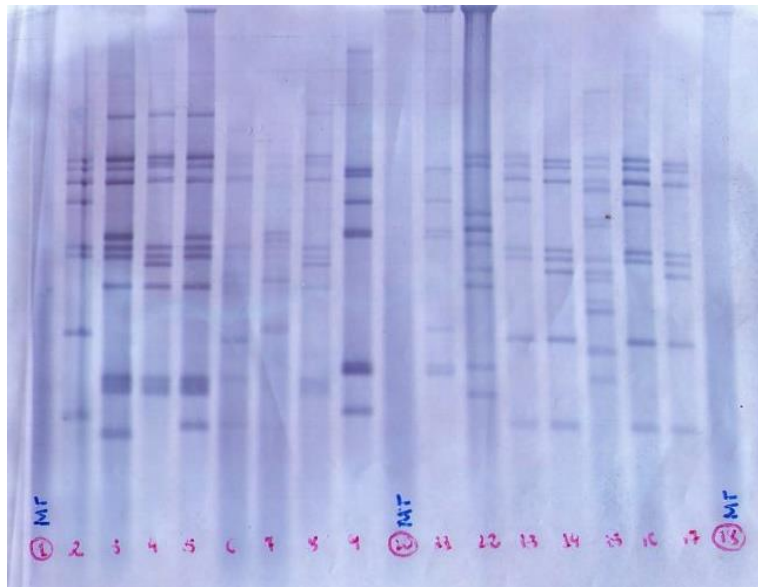


Figura 3. Membrana de nylon revelada pelo método colorimétrico evidenciando fragmentos *IS6110* e genótipos obtidos durante a padronização da técnica RFLP contendo manchas, dificultando a análise. Colunas 1, 10 e 18 - cepa de referência (MT 14323). Colunas 2 a 9 e 11 a 17 isolados estudados.

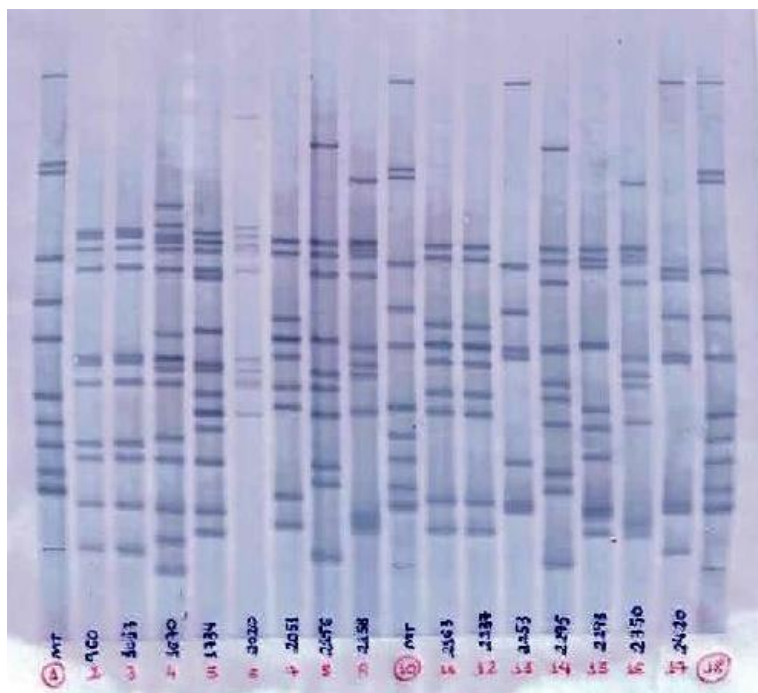


Figura 4. Membrana de nylon revelada pelo método colorimétrico evidenciando fragmentos IS6110 e genótipos obtidos durante a padronização da técnica RFLP com ausência de manchas facilitando a sua análise. Colunas 1, 10 e 18 - cepa de referência (MT 14323).

3.3 Estudo epidemiológico

Uma vez que o protocolo foi padronizado, foi possível fazer o estudo epidemiológico baseando-se nas características genóticas das cepas isoladas dos pacientes com tuberculose no estado do Mato Grosso do Sul.

Notou-se que várias cepas isoladas desses pacientes apresentavam os mesmos perfis moleculares enquanto outras apresentavam padrões de bandas distintos, perfis únicos (Figura 5). Quando duas ou mais cepas apresentaram o mesmo perfil genotípico, foram então agrupadas em *clusters* através do programa RIVM–Bionumerics; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium, através da construção de um dendrograma com as relações filogenéticas das cepas estudadas (Figura 6).

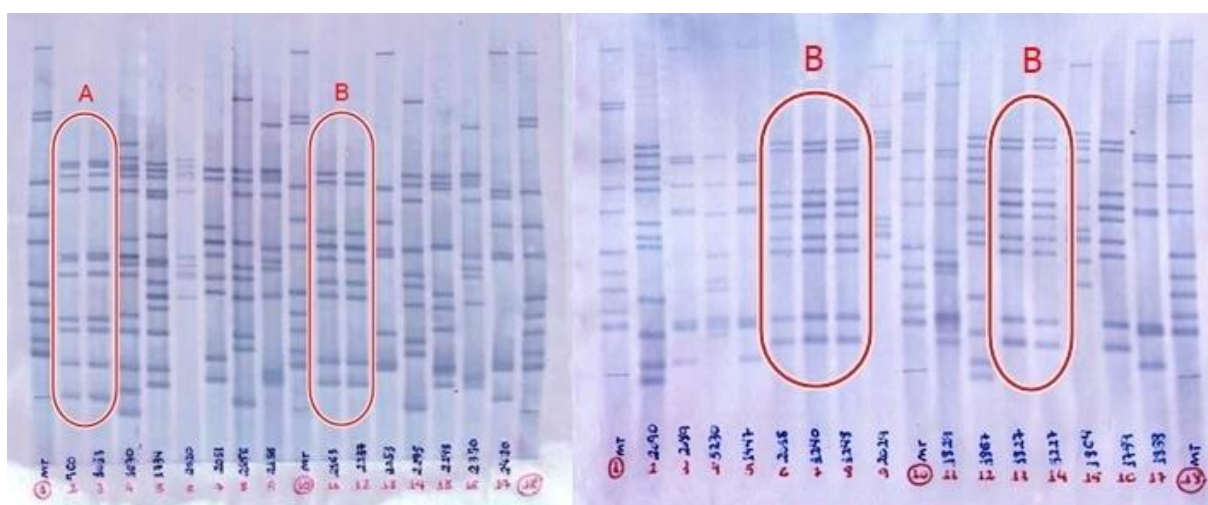


Figura 5. Membranas de nylon revelada pelo método colorimétrico evidenciando fragmentos IS6110 e genótipos obtidos durante a padronização da técnica RFLP. Colunas 1, 10 e 18 - cepa de referência (MT 14323). Isolados **A** formaram um *cluster* enquanto **B** formaram outro *cluster*, apresentando o mesmo padrão genotípico para a sequência de inserção IS6110 para cada *cluster*.

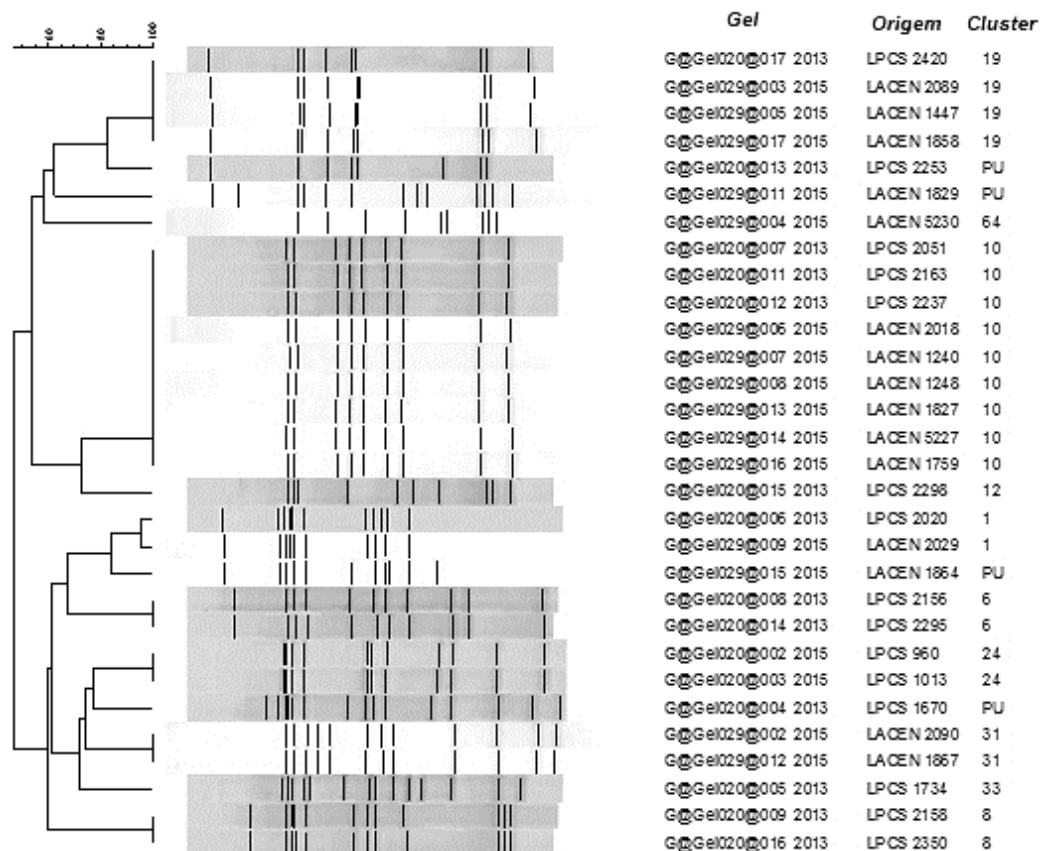


Figura 6. Dendrograma gerado utilizando isolados dos géis da Figura 5 e o agrupamento em *clusters*.

Os isolados que apresentaram o mesmo perfil genotípico quando analisados pelo software Bionumerics foram agrupados em *clusters* que já estavam inseridos no banco de dados contendo todas as amostras analisadas até o momento (Figura 6). Com isso, algumas foram inseridas nesses *clusters* já pré-estabelecidos enquanto outros isolados apresentaram perfis únicos (PU), não se agrupando em nenhum *cluster*.

Em um estudo realizado na cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul, Flávia *et al.*, 2015 utilizando a técnica de RFLP-IS6110 padronizada no Instituto Adolfo Lutz, identificaram 17 *clusters* de 97 isolados de *M. tuberculosis*. Tal estudo evidenciou a relação epidemiológica dos casos de tuberculose da população urbana e privada de liberdade. O encarceramento foi associado com os casos de TB na população urbana e identificou-se que 54% das cepas de *M. tuberculosis* isoladas da população urbana apresentaram o mesmo genótipo dos isolados da população privada de liberdade. Esses achados demonstram a real importância da epidemiologia molecular e consequente padronização das técnicas moleculares nos laboratórios

de pesquisa, em especial da técnica padrão ouro RFLP-IS6110 em nosso município, pioneiro no estado a implementar a metodologia.

Além disso, com a padronização do método de RFLP-IS6110, torna-se possível o melhor entendimento dos mecanismos de transmissão da tuberculose (Diel *et al.*, 2002; Glynn *et al.*, 2008), a identificação dos fatores de risco associadas a transmissão recente da doença (Haase *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2008), além da discriminação entre doença endógena ou exógena (Diel *et al.*, 2002; Lillebaek *et al.*, 2002).

4 Considerações finais

Observou-se a importância da padronização e aplicação da técnica de RFLP-IS6110 para estudos epidemiológicos em tuberculose no estado de Mato Grosso do Sul, uma vez que é possível utilizá-la como ferramenta para melhor conhecer a dinâmica de transmissão da doença em uma determinada população.

Conhecendo mais como o agente transmissor está se manifestando em uma cidade, por exemplo, torna-se possível adotar estratégias de controle da doença de forma que venha a diminuir a incidência de novos casos.

5 Referências Bibliográficas

- BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular Epidemiology of tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 1149-1156, 2007.
- BAUSSANO, I. *et al.* Tuberculosis Incidence in Prisons: A Systematic Review. **PLoS Med**, v. 7, n. 12, p. e1000381, 2010.
- BIDOVEC-STOJKOVIC, U.; ZOLNIR-DOVC, M.; SUPPLY, P. One year nationwide evaluation of 24-locus MIRU-VNTR genotyping on Slovenian *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Respir Med**, v. 105 Suppl 1, p. S67-73, 2011.
- BRASIL. Panorama da tuberculose no Brasil - Indicadores epidemiológicos e operacionais. v. 1, p. 91, 2014.
- BRASIL. Situação Epidemiológica da Tuberculose nos Estados Partes e Associados do MERCOSUL - 2009 a 2013. v. 1, p. 56, 2015.
- BRASIL. Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, p. 1-15, 2016.
- COLLINS, D. M.; DE LISLE, G. W. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. **J Gen Microbiol**, v. 130, n. 4, p. 1019-21, 1984.
- DIEL, R. *et al.* Epidemiology of tuberculosis in Hamburg, Germany: long-term population-based analysis applying classical and molecular epidemiological techniques. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 532-9, 2002.
- FLÁVIA, P. C. S. *et al.* Prisons as Reservoir for Community Transmission of Tuberculosis, Brazil. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 21, n. 3, p. 452, 2015.
- GILLESPIE, S. H. Tuberculosis: evolution in millennia and minutes. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1317-20, 2007.
- GLYNN, J. R. *et al.* Determinants of Cluster Size in Large, Population-Based Molecular Epidemiology Study of Tuberculosis, Northern Malawi. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1060-1066, 2008.

HAASE, I. *et al.* Use of geographic and genotyping tools to characterise tuberculosis transmission in Montreal. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 11, n. 6, p. 632-8, 2007.

JONSSON, J. *et al.* Comparison between RFLP and MIRU-VNTR Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Stockholm 2009 to 2011. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95159, 2014.

KAMERBEEK, J. *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 907-14, 1997.

KANDUMA, E.; MCHUGH, T. D.; GILLESPIE, S. H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. **J Appl Microbiol**, v. 94, n. 5, p. 781-91, 2003.

KREMER, K. ARNOLD, C. *et al.* Discriminatory Power and Reproducibility of Novel DNA Typing Methods for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5628-5638, 2005.

KREMER, K.; AU, B. K. Y. *et al.* Use of Variable-Number Tandem-Repeat Typing To Differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Family Isolates from Hong Kong and Comparison with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing and Spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 314-320, 2005.

KREMER, K. *et al.* Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological Markers for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2607-2618, 1999.

KUDOH, S.; KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 51, n. 1, p. 71-82, 1974.

LEVIN, B. R.; LIPSITCH, M.; BONHOEFFER, S. Population Biology, Evolution, and Infectious Disease: Convergence and Synthesis. **Science**, v. 283, n. 5403, p. 806-809, 1999.

LILLEBAEK, T. *et al.* Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. **J Infect Dis**, v. 185, n. 3, p. 401-4, 2002.

LIMA, A. S. *et al.* Rapid detection and differentiation of mycobacterial species using a multiplex PCR system. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 4, p. 447-52, 2013.

- MATHEMA, B. *et al.* Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 4, p. 658-685, 2006.
- MENDES, J. M. *et al.* Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in a slum area of Rio de Janeiro, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, p. 1063-1068, 2008.
- PANDOLF, J. R. *et al.* Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 251 - 257, 2007.
- PATEL, S.; WALL, S.; SAUNDERS, N. A. Heminested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1686-1690, 1996.
- RODRIGUEZ, C. A. R. *et al.* Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de *Spoligotyping*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p. 277-282, 2004.
- SAHEBI, L. *et al.* Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Strains in the North-West and West of Iran. **Ann Med Health Sci Res**, v. 5, n. 5, p. 334-9, 2015.
- SANTOS, L. C.; KIPNIS, A. P. J.; KIPNIS, A. Métodos Aplicados à Epidemiologia Molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36 (I), p. 1-15, 2007.
- VAN DER SPUY, G. D.; WARREN, R. M.; VAN HELDEN, P. D. The role of molecular epidemiology in low-income, high-burden countries [Editorial]. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 13, n. 4, p. 419-420, 2009.
- VAN EMBDEN, J. D. *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.
- WHO. **Global tuberculosis report 2015**. v. 20, p. 192, 2015.