

## **CONSTRUÇÃO DE SONDA PARA TIPAGEM MOLECULAR DE CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ISOLADOS DE PACIENTES DO ESTADO DE GOIÁS.**

Fernandes, Hernane Bahia<sup>1</sup>; Santos, Lorena Cristina dos<sup>2</sup>; Alves, Sueli Lemes de Ávila<sup>3</sup>; Junqueira-Kipnis, Ana Paula<sup>4</sup>; Kipnis, André<sup>5</sup>.

Palavras chave: Tuberculose, epidemiologia molecular, Mycobacterium tuberculosis

### 1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O *Mycobacterium tuberculosis* é uma das bactérias que mais mata no mundo. Este agente, causador da tuberculose, é responsável pela morte de cerca de 2 milhões de pessoas. O Ministério da Saúde estima que o país apresente uma prevalência de 50 milhões de infectados com aproximadamente 100.000 casos novos e cerca de 5 mil óbitos anualmente [1]. Devido à redução dos investimentos durante duas décadas e o advento da AIDS, ocorreu o aumento da transmissão do *Mycobacterium tuberculosis* [2]. Adicionalmente, a emergência e disseminação de linhagens de *M. tuberculosis* multiresistentes a drogas (MDR-TB) tornou-se uma ameaça para o controle da tuberculose. O tratamento incompleto ou inadequado da tuberculose favorece o desenvolvimento de cepas resistentes. A resistência às drogas antimicrobianas em *M. tuberculosis* é causada pela aquisição de mutações gênicas e a geração de cepas multiresistentes é a consequência de diversas acumulações destas mutações primárias. Estudos epidemiológicos com tuberculose podem ser facilitados pela caracterização molecular das cepas de *M. tuberculosis* [3, 4]. A técnica de polimorfismo após digestão com enzima de restrição (RFLP), ou “restriction fragment length polymorfism”, seguida de hibridização com sondas, utilizando o elemento de inserção IS6110 foi escolhida como um método padrão na comunidade científica para a determinação das cepas de *M. tuberculosis* [5, 6]. Pretendemos analisar por RFLP-IS6110 amostras provenientes de pacientes com baciloscopia positiva pelo método de Ziehl Neelsen, atendidos em um hospital referência de Goiânia no período de Julho de 2005 à Julho de 2006. Esperamos poder correlacionar os perfis genéticos das cepas isoladas neste estudo entre si, assim como com os perfis obtidos em estudos semelhantes com amostras de outras regiões do Brasil e do mundo. A análise do perfil molecular destas cepas em Goiás poderá favorecer o tratamento de pacientes com tuberculose. Outro benefício da caracterização genética será o monitoramento da evolução do *M. tuberculosis*, inserindo o estado de Goiás no contexto brasileiro e mundial do programa de controle da tuberculose.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 - Coleta, baciloscopia, cultura

Realizou-se a coleta das amostras, de acordo com a suspeita clínica, no HDT (Hospital de Doenças Tropicais). Os critérios de inclusão destas amostras foram resultados positivos para baciloscopia (Ziehl-Neelsen) e posterior cultura (Lowestein-Jensen) de

*M. tuberculosis*. Só foram incluídas no estudo culturas positivas dos pacientes que consentiram em participar do estudo, através da assinatura de um termo de consentimento previamente aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Goiás.

## 2.2 - Extração do DNA cromossomal

Após o processamento das culturas e inativação pelo calor das mesmas, realizadas no LACEN (Laboratório Central - Goiás), as amostras foram transportadas para o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) para sua posterior extração de DNA cromossomal de acordo com a técnica descrita por Van Soolingen [7]. As amostras de DNA foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose 1% e estocadas em alíquotas a -20°C.

## 2.3 - Amplificação do elemento de inserção IS6110

A partir de DNA cromossomal da cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, amplificou-se por PCR a região interna do elemento de inserção IS6110 para ser posteriormente clonada e usada como sonda na hibridização das amostras. O produto de PCR foi purificado em gel de agarose usando-se o sistema de extração em gel da Invitrogen.

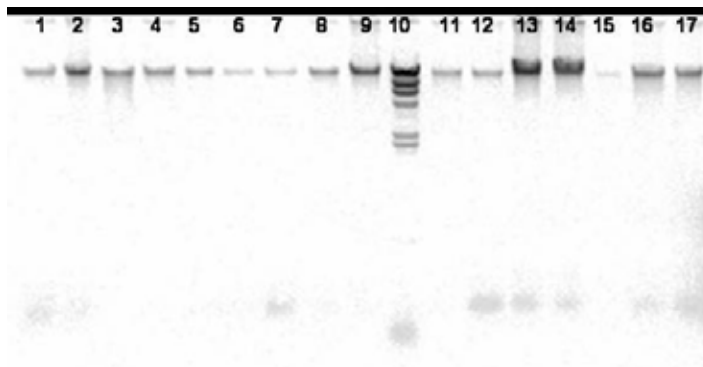
## 2.4 - Clonagem do produto de PCR no plasmídeo pGemT-easy (Promega)

A clonagem do produto de PCR foi feita pela montagem de um sistema de ligação do mesmo com o plasmídeo pGemT-easy. O sistema de ligação foi utilizado para transformar *Escherichia coli* DH5α por eletropuração. Após o crescimento das colônias bacterianas em um meio de cultura seletivo, o DNA plasmidial de alguns transformantes foi extraído. Para a confirmação da presença do inserto, digeriu-se o vetor com a enzima *EcoRI* e o sistema de digestão foi analisado em gel de agarose.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1. Extração do DNA de *M. tuberculosis*

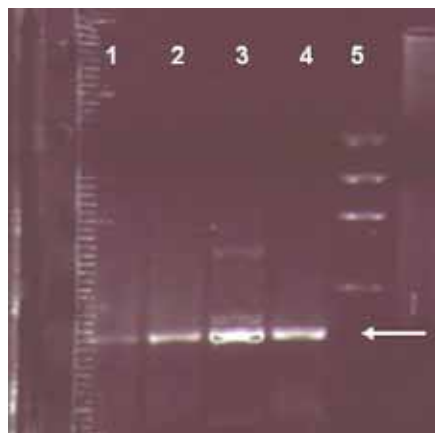
Obtivemos a extração do DNA cromossomal de 100 culturas de *M. tuberculosis*. Esta extração foi confirmada utilizando-se de eletroforese em gel de agarose, mostradas na Figura 1. Estas amostras de DNA serão utilizadas nas etapas posteriores para a técnica de tipagem molecular por RFLP seguida de hibridização com a sonda IS6110. O objetivo final do projeto é atingir 150 amostras de culturas de *M. tuberculosis* e para tanto pretendemos continuar coletando amostras até dezembro de 2006. A partir dos dados coletados, notou-se uma maior prevalência da doença em indivíduos do sexo masculino 80,6% com média de idade de 36 anos. Dentre estes pacientes, 69,9% apresentavam algum fator predisponente à doença sendo que 12,9% eram HIV positivos. Dos cem pacientes entrevistados, 55,9% haviam tomado pelo menos uma dose da vacina BCG e 84,9% estavam tendo a doença pela primeira vez.



**Figura 1.** Gel de agarose de dezesseis amostras de DNA extraídas das culturas de *Mycobacterium tuberculosis*. Faixas 1 a 9 e 11 a 17 correspondem a 16 amostras de DNA cromossomal extraídos de *M. tuberculosis*. Faixa 10 marcador lambda/*Hind*III.

### 3.2 - Amplificação do fragmento de inserção do elemento IS6110

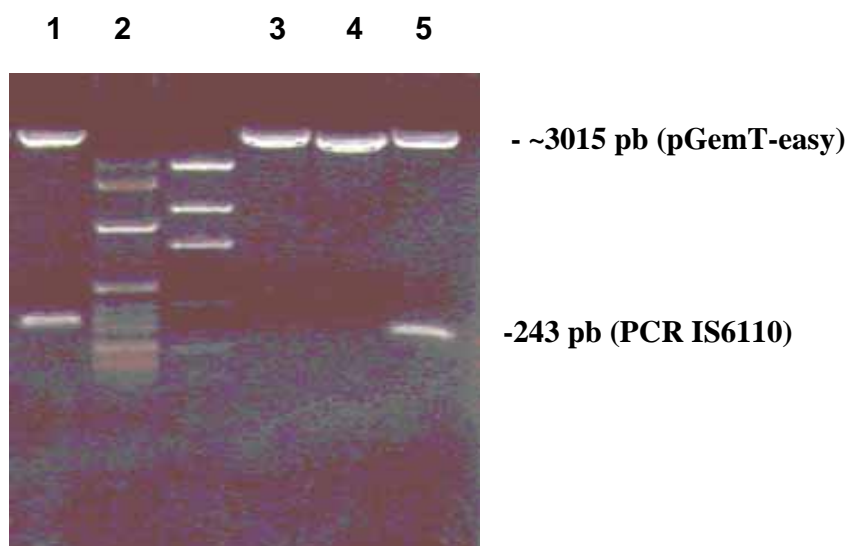
A partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para uma parte do elemento inserção IS6110, e utilizando-se como molde DNA da cepa H37Rv do *M. tuberculosis* (cedida pelo Dr. John Belisle da Colorado State University) obteve-se a amplificação do elemento IS6110. Diversas concentrações de magnésio foram testadas no PCR. O produto do PCR foi confirmado em gel de agarose como mostra a Figura 2, obtendo-se um fragmento de 243 pares de base. Este elemento foi clonado no vetor pGemT-easy (item 3.3) para ser usado como sonda nos experimentos futuros de hibridização.



**Figura 2.** Gel de agarose do produto esperado da amplificação por PCR da seqüência de inserção IS6110. Faixas 1 a 4 produtos do PCR em condições diferentes de concentração de magnésio. Faixa 5 marcador de massa de DNA. Seta, produto esperado da amplificação de 243 pb.

### 3.3 - Clonagem do fragmento de inserção do elemento IS6110 no plasmídeo pGemT-easy

A partir do produto de amplificação do IS6110 montou-se o sistema de ligação com o vetor pGemT-easy e o sistema foi usado para transformar por eletroporação *E. coli* DH5 $\alpha$ . Para facilitar a visualização de clones recombinantes o sistema foi plaqueado em meio contendo o antibiótico de seleção ampicilina e o substrato cromogênico X-gal. Algumas colônias transformantes que se apresentaram lactose negativa (brancas) foram inoculadas em caldo LB com ampicilina e posteriormente tiveram seus plasmídios extraídos e digeridos pela enzima de restrição *EcoRI*. Confirmamos na análise em gel de agarose que alguns plasmídios apresentaram o inserto do tamanho esperado, conforme mostra a figura 3.



**Figura 3.** Gel de agarose da clonagem do fragmento de inserção IS6110 no plasmídeo pGemT-easy. Faixas 1 e 5- pGemT-easy com o inserto IS6110 digerido pela enzima de restrição *EcoRI*; Faixas 3 e 4- pGemT-easy sem o inserto digeridos com *EcoRI*. O marcador de peso molecular de 1KB encontra-se na faixa 2.

## 4. CONCLUSÕES

O método de tipagem molecular de *M. tuberculosis* por RFLP utilizando a sonda do fragmento de inserção IS6110 apresenta um papel relevante no controle da tuberculose em todo o mundo, podendo apresentar importantes resultados para o monitoramento da doença em Goiás. No entanto, para sua completa efetivação, necessitamos de um número significativo de diferentes amostras de DNA cromossomais do bacilo e da sonda do IS6110. Portanto, os resultados obtidos até o momento são fundamentais para a continuidade da pesquisa. A sonda foi clonada com sucesso e apesar de já dispormos de cem amostras, ainda esperamos acrescentar à nossa coleção outras cinquenta para que as análises sejam mais significativas. As amostras de DNA

extraídas até o momento se mostraram de qualidade para as próximas etapas, crucial para atingir com sucesso os objetivos principais por nós pretendidos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde,  
[http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23497](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=23497). 14/08/2006.
- Kanduma, E., T.D. McHugh, and S.H. Gillespie, *Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: a users guide*. J Appl Microbiol, 2003. **94**(5): p. 781-91.
- Lopez, B., et al., *A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(1): p. 30-7.
- Dormans, J., et al., *Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different Mycobacterium tuberculosis genotypes in a BALB/c mouse model*. Clin Exp Immunol, 2004. **137**(3): p. 460-8.
- 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*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(8): p. 2607-18.
- van Embden, J.D., et al., *Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(2): p. 406-9.
- van Soolingen, D., et al., *DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis*. Methods Enzymol, 1994. **235**: p. 196-205.
- 

1-Bolsista Iniciação Científica – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – UFG

2-Bolsista de Mestrado CNPq – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – UFG

3-Biomédica - Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN-GO)

4-Professor Doutor – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – UFG

5-Orientador – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – UFG