

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 dos resultados.....	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**

^aFaculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil. ^bFaculdade 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

^aFaculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.

^bFaculdade 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 -70°C. 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

pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*¹. O *M. tuberculosis* é o principal agente etiológico da tuberculose (TB), que acomete primordialmente os pulmões em 85% dos indivíduos imunocompetentes, entretanto, em pessoas com o sistema imunitário comprometido, a doença dissemina-se em outros tecidos².

O

Brasil esta entre os 22 países priorizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), os quais somam 80% da carga mundial de TB. Em decorrência, o Brasil é ocupante da 19ª posição em relação ao número de casos e da 104ª posição em relação ao coeficiente de incidência².

No estado do Mato Grosso do Sul foram notificados em 1999, 439 casos bacilíferos, 145 extrapulmonares, e cerca de 916 casos relacionados a todas as formas notificadas, mostrando-se relevante, com um coeficiente de 45,2 para todas as formas notificadas³. Nos anos de 2006 e 2008 registrou-se um total de 2808 casos de tuberculose sendo 546 referentes ao município de Dourados⁴. Um grande contribuinte do número de casos de TB na população de Dourados reside na etnia Guaraní-Kaiwá, compreendendo 22.600 indígenas e média de 160 casos ao ano, significando uma taxa de incidência de 700 casos/100 mil habitantes⁵.

Estudos epidemiológicos da tuberculose no município revelaram que a não conclusão do tratamento da TB na população indígena em Dourados no período de 2002 a 2008 sofreu uma redução significativa (90%), contudo uma alta taxa de tuberculose em crianças e jovens indica a transmissão contínua e manutenção da epidemia nessa comunidade⁶. Pesquisa realizada entre Junho de 2009 e Agosto de 2011 demonstra uma taxa de incidência anual de 222 casos/100 mil habitantes nas comunidades indígenas do município e dentre os fatores de risco apontados como associado a infecção foi uma relação potencial entre trabalho em usina de açúcar de cana e infecção por tuberculose entre as populações indígenas⁷. Reforçando a necessidade de implementação de estratégias voltadas para o controle da TB em Dourados.

Nos últimos anos foram introduzidas novas técnicas de detecção e caracterização do *M. tuberculosis* por amplificação do ácido nucléico, minimizando o tempo de identificação do agente patogênico⁸. Neste contexto, técnicas de biologia molecular surgem como uma ferramenta valiosa para auxiliar a elucidação em estudos epidemiológicos como prévia detecção de surtos, monitoramento de circulação de estirpes, detecção facilitada de falsos positivos, distinção de episódios de reinfecção e recaída, avaliação de investigação de contato e assim auxílio na implementação de medidas de controle^{9,10}.

Um método altamente discriminatório e o mais utilizado em genotipagem, com princípio nas variações da sequência de DNA do genoma bacteriano trata-se da Análise do

Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) baseados em sequências repetitivas IS6110 padronizado mundialmente, porém constitui uma técnica trabalhosa, que exige profissionais qualificados, a qual tem sido substituída por outras de execução mais rápida e fácil¹¹.

Diversos estudos se referem as técnicas de *spoligotyping* e VNTR-MIRU como de referência em epidemiologia molecular do *M. tuberculosis*, sendo baseadas em tecnologias simples de amplificação por PCR, que podem ser traduzidas em códigos numéricos de interpretação direta⁹. Sua elevada resolução, rápida execução, comparabilidade de resultados entre laboratórios, possibilidade de análise de alto rendimento, tornam esta técnica muito utilizada. A tipagem VNTR-MIRU revela o número de repetições em tandem, por análise de produto de PCR em gel de agarose, onde o número de repetições é calculado baseando-se em dados já publicados¹². Devido à complexidade das técnicas de biologia molecular e mesmo com a disponibilização de protocolos conhecidos e bem estudados, existe a necessidade de adequação e direcionamento destas técnicas para a realidade de cada laboratório. A amplificação de ácidos nucleicos varia de acordo com protocolos, em diferentes parâmetros como temperatura, *primers* utilizados, número de ciclos e tratamentos das amostras¹³. Dessa forma o presente estudo propõe estabelecer e padronizar a técnica de MIRU, de acordo com as condições encontradas no laboratório de virologia e bacteriologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados, como contribuição para eventuais pesquisas em epidemiologia molecular da tuberculose na cidade de Dourados e região.

MÉTODOS

Cultivo da Cepa de Referência

Foi utilizada a cepa de *M. tuberculosis* padrão de referência H37Rv. A mesma foi cultivada em meio de cultura *Ogawa-Kudoh* (O-K)¹⁴ e mantida em estufa 37°C por um período de oito semanas, para acompanhamento do crescimento. A cepa H37Rv isolada no meio de cultura foi mantida em Meio de Sauton (Himedia - L-asparagina; Sulfato de magnésio; Ácido cítrico; Citrato férrico amoniacal; Glicerina e Água destilada) com glicerol 10%, armazenada em criotubos em freezer -70°C, para posterior utilização.

Extração do DNA

A extração de DNA genômico da cepa foi realizada através da utilização de Kit comercial QIAamp DNA Mini Kit protocol (QIAGEN, Hilden, Germany), conforme recomendações do fabricante. A PCR foi realizada utilizando-se 24 pares de *primers* de 12

loci MIRU, 9 loci VNTR, 2 loci QUB e 1 loci ETR que podem ser visualizados na figura 1, de acordo com as descrições do estudo de De Beer e Kremer¹⁵.

Primer sequences and alias designations of the VNTR-loci for Method 1				
Mix	Locus	Alias	Sequence (optional label)	Work solution, concentration (µM)
Mix 1	580	MIRU 4 / ETR-D	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM)	4
			GCGCAGCAGAAAACGCCAGC	20
	2996	MIRU 26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	20
	802	MIRU 40	CATAGGCGACCAGGCCAATAG (VIC)	4
			GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED)	4
			GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	20
Mix 2	980	MIRU 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	20
			GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)	4
	1644	MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA	20
			CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)	4
	3192	MIRU 31 / ETR-E	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	20
			GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)	4
Mix 3	424	VNTR 42	CTTGCCCGGCATCAAGCGCATTATT	20
			GCCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC (FAM)	2
	577	VNTR 43 / ETR-C	CGAGAGTGGCAGTGCCGGTTATCT (VIC)	4
		AATGACTTGAACCGCGCAAATTGTGA	20	
	2165	ETR A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED)	8
			CGAAGCCTGGGTGCCCGCGATT	20
Mix 4	2401	VNTR 47	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM)	4
			ACTTGAACCCACGCCCATTAGTA	20
	3620	VNTR 52	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC)	4
			TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	20
	4156	VNTR 53 / QUB-4156c	TGACCACGGATTGCTCTAGT	20
			GCCGGCGTCCATGTT (NED)	20
Mix 5	2183b	QUB-11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG	20
			CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)	8
	1955	VNTR 1955	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (VIC)	4
			CAACATCGCCTGGTTCTGTA	20
	4052	QUB-26	AACGCTCAGCTGTCGGAT (NED)	8
			CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCCTCCCGAT	20
Mix 6	154	MIRU 2	TGGACTTGACGCAATGGACCAACT	20
			TACTCGGACGCCGGCTCAAAT (FAM)	4
	2531	MIRU 23	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG (VIC)	4
			AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGT	20
	4348	MIRU 39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC	20
			CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT (NED)	4
Mix 7	2059	MIRU 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM)	4
			GGAGACCGCGACCAGGTA	20
	2687	MIRU 24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT	20
			GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (VIC)	2
	3007	MIRU 27 / QUB-5	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA	20
			GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)	4
Mix 8	2347	VNTR 46	GCCAGCCGCGGTGCATAAACCT (FAM)	4
			AGCCACCCGGTGTGCTTGTATGAC	20
	2461	VNTR 48 / ETR-B	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (VIC)	2
			CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC	20
	3171	VNTR 49	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA (NED)	4
			GCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC	20

Figura 1. Sequência dos pares de *primers* utilizados na técnica MIRU-VNTR segundo a metodologia de De Beer e Kremer¹⁵.

MIRU-VNTR

A técnica de MIRU-VNTR foi realizada para cada par de *primer* descrito na (figura 1). Cada uma destas reações continham: DNA extraído, HotStarTaqPolymerase (5 U/µ); dATP, dCTP, dGTP, e dTTP (10 mM); Tampão PCR 10X; solução Q (5x); MgCl₂ (25 mM); *primers* (20 µM) e água ultra-pura. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por

15 min, 95°C por 1 min, 59°C por 1 min 72°C por 1 min repetidos por 30 ciclos e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min segundo protocolo¹⁵.

Eletroforese em gel de agarose e análise dos resultados

Os produtos amplificados por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% preparado com tampão TBE e corante SYBR SAFE DNA GEL STAIN (Invitrogen - 10,000X concentrado em DMSO), a cada 9 µl de produto de PCR foi adicionado 3 µl de DNA Loading Dye e aplicado 10 µl no gel, o qual foi submetido a corrida eletroforética a uma corrente de 80 V. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com marcadores de peso molecular de 50 pb e 100 pb. O número de cópias MIRU por locus foi calculada através do padrão de bandas das imagens geradas por eletroforese usando as convenções descritas por De Beer e Kremer¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A padronização da técnica de PCR requer um criterioso processamento de suas etapas para seu estabelecimento¹³. Este trabalho propôs utilizar o protocolo descrito por De Beer e Kremer¹⁵ o qual foi seguido sem adaptações, gerando resultados satisfatórios.

A cepa padrão de *M. Tuberculosis* H37Rv foi cultivada, mantida e armazenada nos meios e condições citadas anteriormente com sucesso. A extração de DNA genômico realizada apresentou bons resultados, juntamente com a amplificação, os quais foram observados através da visualização do padrão de bandas gerados no gel de agarose, conforme demonstrado na (figura 2.)

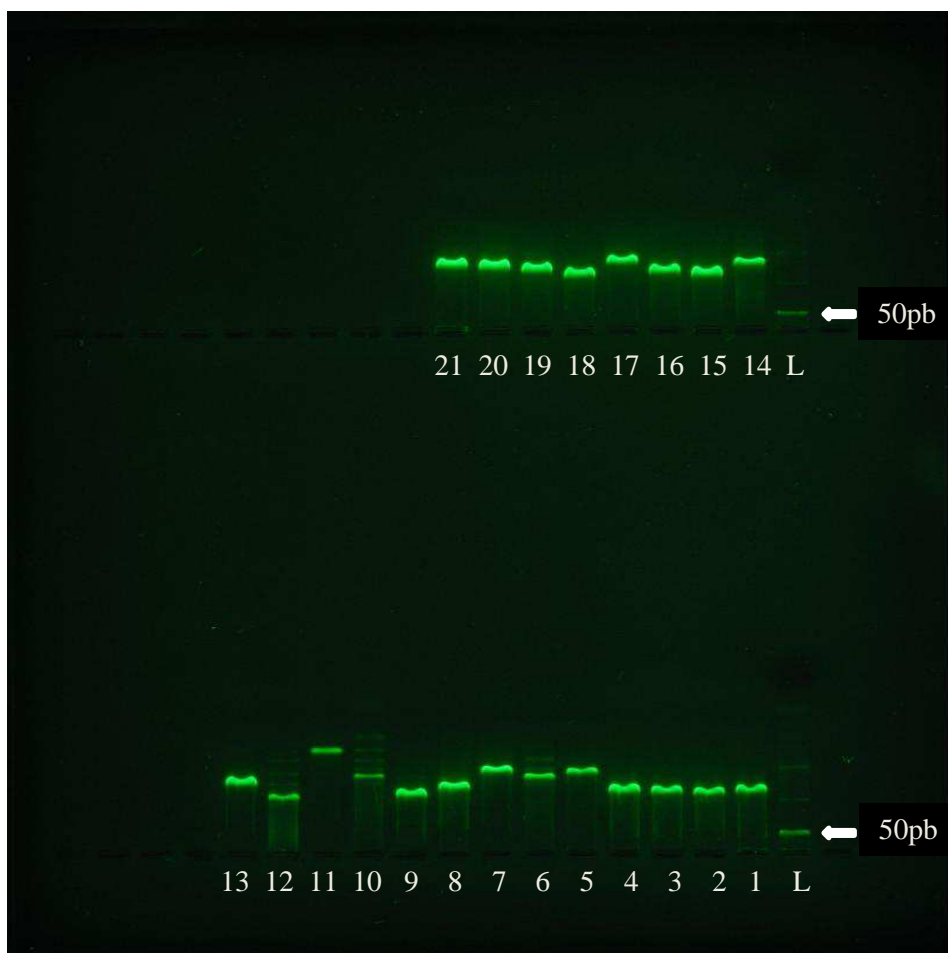


Figura 2. Produto da amplificação por MIRU-VNTR de 21 locus da cepa padrão H37Rv visualizado em gel de agarose, *(L) ladder de 50 pb. UFGD, Dourados – MS, 2012.

Após a extração e amplificação, foram estimados os tamanhos dos fragmentos amplificados no gel por comparação com marcadores moleculares de 50-pb e 100-pb. Como o comprimento das unidades de repetição é conhecido, os tamanhos dos produtos de PCR refletem o número de repetições em cada locus VNTR e dessa forma foi calculado o código numérico, correspondente ao número de repetições em *tandem*, refletindo o DNA *fingerprint* do isolado bacteriano. Sendo assim, foi constatado que o objetivo do trabalho foi alcançado, pois cada amostra equivalente ao par de primer ou loci da cepa padrão de referência H37Rv apresentaram o tamanho e número de pares de base correspondentes aos descritos na literatura (Tabela 1), mostrando que esta técnica reprodutível foi padronizada para as condições encontradas neste laboratório.

Tabela 1. Número de repetição encontrado e o padrão esperado para cada um dos 24 loci VNTR da estirpe de controle H37Rv, segundo a normatização internacional¹⁵. UFGD, Dourados – MS, 2012.

Locus	Resultado encontrado	Padrão H37Rv	Locus	Resultado encontrado	Padrão H37Rv
MIRU 04	400 pb = 3	3	QUB-11b	417 pb = 5	5
MIRU 26	437 pb = 3	3	VNTR 1955	203 pb = 2	2
MIRU 40	401 pb = 1	1	QUB-26	712 pb = 5	5
MIRU 10	638 pb = 3	3	MIRU 02	502 pb = 2	2
MIRU 16	670 pb = 2	2	MIRU 23	465 pb = 6	6
MIRU 31	650 pb = 3	3	MIRU 39	640 pb = 2	2
VNTR 42	638 pb = 2	2	MIRU 20	577 pb = 2	2
VNTR 43	364 pb = 4	4	MIRU 24	440 pb = 1	1
ETR-A	420 pb = 3	3	MIRU 27	651 pb = 3	3
VNTR 47	363 pb = 2	2	VNTR 46	557 pb = 4	4
VNTR 52	503 pb = 5	5	VNTR 48	277 pb = 3	3
VNTR 53	673 pb = 2	2	VNTR 49	472 pb = 3	3

A principal dificuldade no diagnóstico da tuberculose é o tempo necessário para sua confirmação, dificuldade que aliada à necessidade de identificação e distinção de linhagens para entender a dinâmica de transmissão, contribuíram para desenvolvimento de métodos baseados em marcadores moleculares linhagem-específicos, DNA *fingerprint*¹⁰.

Atualmente a técnica MIRU tem sido reconhecida e sugerida internacionalmente como de primeira linha na tipagem de *M. tuberculosis*⁷. Ela se baseia na técnica de PCR estudando os VNTRs, ou seja, sequências repetitivas no genoma. Esta técnica foi desenvolvida por Suply et. al¹¹ em estudo detalhado de 12 loci que possuem VNTRs de *M. tuberculosis* e constitui um método altamente reprodutível e muito informativo, pois identifica o número de repetições de cópias em loci específico que possibilita a comparação entre linhagens de diversos sítios geográficos e detecção de movimentos de linhagens individuais. Desta forma os métodos de tipagem molecular possuem preponderante importância em relação ao monitoramento da transmissão da tuberculose nos países endêmicos⁹.

Contudo, devido a grande incidência de casos notificados no estado Mato Grosso do Sul, em particular na cidade de Dourados⁴, faz-se necessário estudos epidemiológicos da doença. Portanto, este trabalho é de considerável importância, pois a partir da padronização desta técnica é possível iniciar estudos de epidemiologia molecular de cepas circulantes no Estado, investigar potenciais fontes de infecção, determinar perfis genotípicos associados ao

aumento da virulência, resistência e identificar possíveis surtos, auxiliando dessa forma na implementação de medidas de prevenção e controle desta doença no município de Dourados.

CONCLUSÃO

Ao instalar o protocolo proposto sem modificações, para as condições do laboratório de Virologia e Bacteriologia da FCS na UFGD, foi possível padronizar a técnica de genotipagem MIRU-VNTR de acordo com a normatização internacional, sem maiores dificuldades. Confirmando o fato desta ser reconhecida como uma técnica que consiste em um sistema altamente reprodutível e rápido¹¹.

REFERÊNCIAS

1. ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 53, p. 1785–1789, 2003.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control 2004: epidemiology, strategy, financing. Geneva: **World Health Organization**; 2009.
3. RUFFINO-NETO A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 35, p. 51-58, 2002.
4. **Saúde Md. Sistema de Informação Agravos de Notificação (SINAN).** 2009.
5. MARQUES, A. M.; DA CUNHA, R. V. Assisted treatment and tuberculosis cure and treatment dropout rates in the Guarani-Kaiwa Indian nation in the municipality of Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Cad. Saúde Pública.** v. 19, p. 1405-11, 2003.
6. M.G. CRODA et al., Tuberculosis control in a highly endemic indigenous community in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 106, p. 223– 229, 2012.
7. SACCHI, F. P. C. et al., Sugar cane manufacturing is associated with tuberculosis in an indigenous population in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,** v.107, p. 152-157, 2013.
8. WINN JR, W. A., S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. (Ed.) **Koneman, Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.** Rio de Janeiro: Guanabara koogan, sexta edição ed., p.1565, 2008.
9. DAVID, S. Utilização estratégica da genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis* no controlo da tuberculose. **Rev. Portuguesa de Pneumologia.** Porto, Vol XIV N.º 4, 2008.

10. SANTOS, L.C. et al., Métodos Aplicados à Epidemiologia Molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. de Patologia Tropical**. Goiás, v. 36, p. 1-15, 2007.
11. SUPPLY, P.; LESJEAN, S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; 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, p. 3563-3571, 2001.
12. COWAN L. S. et al., 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, p. 1592-1602, 2002.
13. BOLLELA VALDES R. et al., Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Rev. Saúde Pública**, v.33, p. 281-6, 1999.
14. SUSEMIHL, M. A. A. M. M. F., L.; UEKI, S.Y.M.; GIMENEZ, R.D.; PALACI, M. Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o cultivo de micobactérias. **Rev. Brasileira de Patologia Clínica**, v. 29, p. 51-54, 1993.
15. DE BEER, J.; KREMER, K. Multilocus variable numbers of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. **ECDC project team (RIVM)**. 2010.