

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA**

**EPIDEMIOLOGIA CLÁSSICA E MOLECULAR DA TUBERCULOSE
PULMONAR EM PACIENTES DA REGIÃO NORTE DE MINAS GERAIS**

Karina Andrade de Prince

ARARAQUARA-SP

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCIÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA**

**EPIDEMIOLOGIA CLÁSSICA E MOLECULAR DA TUBERCULOSE
PULMONAR EM PACIENTES DA REGIÃO NORTE DE MINAS GERAIS**

Karina Andrade de Prince

Tese apresentada ao o Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de concentração: Microbiologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, para obtenção do Título de Doutora em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

**Prof^a. Dra. Clarice QueicoFujimura Leite
ORIENTADORA**

**ARARAQUARA-SP
2013**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Prince, Karina Andrade de
P955e Epidemiologia clássica e molecular da tuberculose pulmonar em pacientes da região norte de Minas Gerais / Karina Andrade de Prince. – Araraquara, 2013
114 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Clarice Queico Fujimura Leite

1. Tuberculose pulmonar. 2. Epidemiologia Clássica. 3. Molecular I.
Leite, Clarice Queico Fujimura, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICO

À DEUS. Eu te amarei do coração, ò SENHOR, fortaleza minha. O SENHOR é o meu rochedo, o meu lugar forte, e o meu libertador; o meu Deus, a minha fortaleza, em quem confio; o meu escudo, a força da minha salvação e o meu alto refúgio. Na angústia invoquei o SENHOR, e clamei ao meu Deus; desde o seu templo ouviu a minha voz e aos seus ouvidos chegou o meu clamor perante a sua face. Surpreenderam-me no dia da minha calamidade; mas o SENHOR foi o meu amparo. Trouxe-me para um lugar espaçoso; livrou-me, porque tinha prazer em mim. Recompensou-me o SENHOR conforme minha justiça e retribuiu-me conforme a pureza das minhas mãos. Porque guardei os caminhos do SENHOR e não me apartei impiamente do meu Deus. **SALMO 18.**

Aos meus pais José Augusto de Príncipe e Izilda Aparecida de Andrade de Príncipe. A vida dedico a minha mãe que me ensinou a vivê-la com dignidade. O futuro a meu pai que se deu inteiro e renunciou a seus sonhos para realizar os meus. Sou o que sou às custas de seus sacrifícios. Sejam, pois estas palavras a expressão de minha gratidão e infinito amor.

Ao meu querido filho Mateus Augusto de Príncipe. Pela compreensão a minha imensa ausência. Meu filho te amo muito.

Aos meus irmãos Peterson Donizete Andrade de Príncipe, Priscila Maria Andrade de Príncipe e Gustavo José de Príncipe pelo incentivo aos meus objetivos.

Aos meus sobrinhos Lucas Príncipe Oliani e Augusto de Príncipe. Obrigada por Alegregar a minha vida!

Ao meu noivo Andrey Campos Ruas. Pela compreensão

durante a intensa dedicação que este trabalho exigiu, pela preocupação e incentivos constantes que me fortaleceram nos momentos críticos.

Aos eternos amigos do laboratório Prof. Dr. Hugo David: Leonardo, Paula, Marcelo e em especial ao meu querido amigo Adolfo pela imensa contribuição na finalização deste trabalho. Muito Obrigada a todos!

Aos Mestres. A nossa convivência vem de longa data e dela aprendemos que ser mestre e amigo vão muito além do significado dessas palavras. Para isso é preciso tranquilidade e vontade de compartilhar os conhecimentos e permitir o crescimento do outro; é ser amigo nas horas e momentos em que pensamos estar sozinhos. O meu agradecimento e profunda admiração.

Um Guerreiro da luz compartilha com os outros o, que sabe do caminho. Quem ajuda, sempre é ajudado e precisa ensinar o que aprendeu. Paulo Coelho.

Que a ciência possa gerar cada vez mais dúvidas e incertezas, para que, a cada trabalho, tenhamos novas perguntas e que a cada pergunta possamos ter novas respostas. E que assim a ciência possa prosperar entre perguntas e respostas.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora professora Dra Clarice Queico Fujimura Leite, pelas contribuições na estruturação deste trabalho, pelas orientações na condução da pesquisa e sugestões na revisão do texto. Muito Obrigada!

A Dra Regiane Priscila Ratti sartori pelo intenso apoio e colaboração na realização deste trabalho. Obrigada por ter acreditado no meu potencial.

A Dra Daisy Nakamura Sato pela padronização das técnicas realizadas, ensinamentos e relevantes sugestões, que enriqueceram o conteúdo do trabalho.

Ao Drº Fernando Rogério Pavan sempre prestativo e amigo nos momentos mais difíceis.

Ao Drº Carlos Eduardo Mendes DAngelis pelas imensa contribuição na correção da tese e pelo apoio na realização deste trabalho.

CAPÍTULO I

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa crônica causada principalmente pelo bacilo aeróbico *Mycobacterium tuberculosis*. Ela provoca problemas de saúde entre milhões de pessoas a cada ano, sendo classificada como a segunda causa de morte por uma doença infecciosa em todo o mundo. Assim, o objetivo desse estudo foi analisar a epidemiologia clássica e molecular da tuberculose pulmonar, em pacientes do Norte de Minas Gerais. Foi realizado um levantamento epidemiológico, de caráter observacional, longitudinal, retrospectivo e de delineamento quantitativo. A população foi composta por pacientes com suspeita de TB pulmonar, residentes na Região Norte de Minas Gerais, atendidos no Hospital Universitário Clemente de Faria (HUCF) da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), no período de janeiro de 2011 a dezembro 2012. As amostras clínicas (escarro ou lavado broncoalveolar) destes pacientes foram analisadas, através da técnica de Ziehl-Neelsen e da cultura pela método de Ogawa-Kudoh. Os isolados clínicos obtidos foram submetidos a identificação molecular, a genotipagem pelas técnicas de *Spoligotyping*, RD^{Rio}, ERIC-PCR e MIRU-VNTR e ao teste de susceptibilidade a fármacos. A correlação epidemiológica clássica e molecular foi realizada através dos dados da genotipagem e dos dados epidemiológicos clássicos. Dos 345 pacientes avaliados, 33 (9,6%) apresentavam a doença, sendo 69,7% residentes em Montes Claros e 30,3% em outras cidades do Norte de Minas Gerais. Houve predomínio da TB em indivíduos do sexo masculino (75,8%), da etnia parda (60,6%), de baixa escolaridade (42,4%) e em idade economicamente ativa (78,9%). A maior parte dos casos eram novos (69,7%) e a baciloscopia foi positiva em 75,8% dos pacientes. A taxa de cura foi baixa (30,3%) e a de transferência elevada (30,3%). Os agravos mais evidentes continuam sendo, a co-infecção TB/HIV (6,1%) e o alcoolismo (24,25%). A análise dos 33 isolados clínicos através da técnica de *Spoligotyping* permitiu a identificação de 22 perfis genéticos distintos (66,7% diversidade genética). Dentre os perfis genéticos encontrados 15 (45,5%) pertencem a família LAM, 04 (18,2%) a família T, 01 (3,0%) a família *Haarlen* (H), 08 (24,2%) ao perfil *Undesignated* (U) e 03 (9,1%) foram designados como perfis novos. Os isolados da família LAM foram avaliados quanto a deleção RD^{Rio} e 10 (66,7%) apresentaram tal perfil de virulência. Em relação ao ERIC-PCR, 18 (54,5%) isolados foram agrupados em 09 grupos com mais de 96% de similaridade e no MIRU-VNTR 12-*loci*, 16 (48,5%) isolados foram agrupados em 08 grupos com mais de 90% de similaridade. Pela associação das técnicas de ERIC-PCR e de MIRU-VNTR, 12 isolados (26,4%) foram agrupados em 06 grupos com mais de 90% de similaridade. No entanto 2 grupos genéticos foram identificados por ambas as técnicas, sugerindo que a associação das técnicas de ERIC e MIRU apresentam sensibilidade semelhante na discriminação das diversidades genéticas. Este tipo de estudo é importante para traçar relações entre os isolados de *M. tuberculosis*, podendo assim, ajudar a interromper a cadeia de transmissão da TB através da identificação dos perfis genéticos encontrados. A associação de ferramentas mais discriminatórias (ERIC-PCR / MIRU-VNTR) e um período mais longo de estudo é fundamental para uma melhor compreensão da TB na Região Norte de Minas Gerais.

Palavras chave: Tuberculose pulmonar, Epidemiologia Clássica e Molecular.

ABSTRACT

Tuberculosis is a chronic infectious disease caused by the bacillus aerobic *Mycobacterium tuberculosis*. It causes health problems among millions of people each year, being ranked as the second leading cause of death from infectious disease worldwide. Thus, the aim of this study was to analyze the epidemiology of classical and molecular pulmonary tuberculosis in patients in North of Minas Gerais. We conducted an epidemiological study, an observational, longitudinal, retrospective and quantitative design. The population consisted of patients with suspected pulmonary TB, residents in the north of Minas Gerais patients at the University Hospital Clemente de Faria (HUCF), State University of Montes Claros (UNIMONTES), from January 2011 to December 2012. The clinical samples (sputum or bronchoalveolar lavage) of these patients were analyzed by Ziehl-Neelsen staining and culture by the method of Ogawa-Kudoh. Clinical isolates were subjected to molecular identification, genotyping by *Spoligotyping* techniques, RD^{Rio}, ERIC-PCR and MIRU-VNTR and drug susceptibility testing. The classical and molecular epidemiological correlation was performed using data from genotyping and classical epidemiological data. Of the 345 patients evaluated, 33 (9.6%) had the disease, with 69.7 % living in Montes Claros and 30.3 % in other cities in northern Minas Gerais. There was a prevalence of TB in males (75.8%), of mulattoes (60.6%), low education (42.4 %) and working age (78.9%) . The majority of new cases were (69.7%) and the smear was positive in 75.8 % of patients. The cure rate was low (30.3%) and high transfer (30.3 %). The most obvious grievances remain, the co -infection TB / HIV (6.1%) and alcoholism (24.25%) . Analysis of 33 clinical isolates by *Spoligotyping* allowed the identification of 22 different genetic profiles (66.7% genetic diversity). Among the genetic profiles found 15 (45.5%) LAM, 04 (18.2 %) belong to T family, 01 families (3.0%) to Haarlen family (H) , 08 (24.2%) to undesignated profile (U) and 03 (9.1%) were designated as new profiles . Isolates of the LAM family were evaluated for RD^{Rio} and 10 (66.7%) showed deletion of such virulence profile. Regarding ERIC -PCR, 18 (54.5%) isolates were grouped into 09 groups with more than 96 % similarity and MIRU - VNTR loci 12 , 16 (48.5%) isolates were grouped into 08 groups with more than 90 % similarity. By association techniques ERIC - PCR and MIRU - VNTR, 12 isolates (26.4 %) were grouped into 06 groups with more than 90 % similarity. However two genetic groups were identified by both techniques, suggesting that the combination of techniques and ERIC MIRU present similar sensitivity for the detection of genetic diversity. This type of study is important to trace relationships between isolates of *M. tuberculosis* and may thus help break the chain of transmission of TB by identifying genetic profiles found. The association of more discriminatory tools (ERIC - PCR / MIRU - VNTR) and a longer study period is crucial for a better understanding of TB in the North of Minas Gerais.

Keywords: Tuberculosis pulmonary, Classical and Molecular Epidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<p>Figura 1: Gel de agarose a 1% na confirmação molecular dos isolados de <i>M. tuberculosis</i>, utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores INS1 e INS2 a apresentando um fragmento de 245pb, um marcador de peso molecular (100pb).....</p>	43
<p>Figura 2: Mapa construído usando Google Maps® contendo todas as cidades do Norte de Minas Gerais presentes neste estudo.....</p>	45
<p>Figura 3: Dendrograma de <i>Spoligotyping</i> construído com auxílio do programa Bionumerics® utilizando correlação de Pearson com 33 isolados.....</p>	54
<p>Figura 4: Dendrograma de ERIC-PCR construído com auxílio do programa Bionumerics® utilizando correlação de Pearson com 33 isolados.....</p>	57
<p>Figura 5: Dendrograma de MIRU-VNTR construído com auxílio do programa Bionumerics® utilizando correlação de Pearson com 33 isolados.....</p>	60
<p>Figura 6: Dendrograma de ERIC associado ao MIRU construído com auxílio do programa Bionumerics® utilizando correlação de Pearson com 33 isolados.....</p>	62
<p>Gráfico1: Porcentagem das Idades dos Pacientes com TB Pulmonar atendidos no HUCF, 2011-2012.....</p>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desenho dos 12 pares de oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) empregados na técnica de MIRU-VNTR.....	40
Tabela 2: Procedência dos Pacientes com TB Pulmonar Atendidos no HUCF. Montes Claros, Minas Gerais, 2011 – 2012.....	45
Tabela 3: Dados Epidemiológicos clássicos sócio-demográficos e clínicos dos pacientes com tuberculose pulmonar. Montes Claro, Minas Gerais, 2011 – 2012.....	48
Tabela 4: Agravos Associados aos Pacientes com Tuberculose Pulmonar e Tratamento Supervisionado (DOTS). Montes Claro, Minas Gerais, 2011 - 2012.....	49
Tabela 5: Famílias de <i>M. tuberculosis</i> encontradas em isolados de pacientes do Norte de Minas Gerais utilizando a técnica de Spoligotyping.....	52
Tabela 6: Relação dos spoligotipos obtidos dos 33 isolados de <i>M. tuberculosis</i> , com os dados demográficos, epidemiológicos e genotípicos.	53
Tabela 7: Resultados dos isolados pertencentes a família LAM que foram classificados nas sublinhagem RD ^{Rio} ou WT.....	55
Tabela 8: Grupos genéticos com similaridade superior a 90% obtidos ERIC-PCR.....	56
Tabela 9: Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles.....	59
Tabela 10: Grupos genéticos com similaridade superior a 90% obtidos MIRU-VNTR.....	60
Tabela 11: Grupos genéticos com similaridade superior a 90% obtidos com a associação entre ERIC-PCR e MIRU-VNTR.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – microlitro
 μM – micromolar
a. c – antes de Cristo
AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR - Bacilos Álcool Ácido Resistentes
CIM – Concentração Inibitória Mínima
Cluster – grupo genético
DMSO – *Dimetil Sulfóxido*
DOTS – *Direct Observed Treatment Strategy Short-Course*
DR – *Direct Repeats*
ERIC – *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HUCF – Hospital Universitário Clemente de Faria
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICA – Instituto de Ciências Agrárias
IDH – Índice de Desenvolvimento Humano
INH – Isoniazida
kDa – kiloDaltons
LAM – *Latin American-Mediterranean*
LPS – *Long Sequence Polymorphism*
M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*
MG - miligrama
MG – Minas Gerais
MIRU - *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*
mL – mililitros
mM – milimolar
MS – Ministério da Saúde
°C – Graus Celsius
ODM – Objetivos de Desenvolvimento do Milênio
OK - Ogawa
OMS – Organização Mundial da Saúde
ONU – Organizações das Nações Unidas
pb – pares de base
PCR – *Polymerase Chain Reaction*(Reação de polymerase em Cadeia)
pH - potencial de hidrogênio iônico
PNCT - Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PZA - Pirazinamida
REMA – *Resazurim Microtiter Assay*
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RMP – Rifampicina
rpm – rotações por minuto
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIT – *Shared International Type*
Spoligotyping - *Spacer Oligonucleotide Typing*
ST – *Shared Type*
SVS – Sistema de Vigilância em Saúde
TB – Tuberculose

TBE – Tris Ácido Bórico EDTA
TBMDR – Tuberculose Multidroga Resistente
TE – Tris-EDTA
TS/TDO – Tratamento Supervisionado
U/ μL – Unidades por microlitro
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UNIMONTES – Universidade Estadual de Montes Claros
VNTR – *Variable number of tandem repeats*
WT – *wild type* (tipo selvagem)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1.0 Introdução.....	14
1.1 Histórico da Tuberculose.....	14
1.2 Situação Atual da Tuberculose.....	17
1.3 Região Norte de Minas Gerais.....	21
1.4 Identificação Fenotípica da Tuberculose.....	23
1.5 Ferramentas Moleculares.....	24
2.0 Objetivos.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3.0 Material e Métodos.....	29
3.1 Cuidados Éticos.....	29
3.2 Tipo de Estudo.....	29
3.3 Amostragem.....	30
3.4 Obtenção das Amostras Clínicas para estudo Epidemiológico.	30
3.4.1 Colheita das amostras clínicas.....	31
3.4.2 Baciloscopia.....	31
3.4.3 Cultura e Isolamento.....	31
3.5 Identificação dos Isolados Clínicos.....	31
3.5.1 Extração de DNA por Termólise.....	32
3.5.2 Identificação do <i>M. tuberculosis</i> pela técnica PCR.....	32
3.6 Genotipagem dos Isolados Clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	33
3.6.1 Técnica de <i>Spoligotyping</i>	34
3.6.2 Técnica do RD ^{Rio}	36
3.6.3 Técnica de ERIC-PCR.....	37
3.6.4 Técnica de MIRU-VNTR.....	38
3.7 Correlação Epidemiológica Clássica e Molecular.....	40
3.8 Teste de Susceptibilidade à Fármacos.....	41
4.0 Resultados.....	43
4.1 Diagnóstico Laboratorial.....	43
4.2 Diagnóstico Molecular.....	43
4.3 Dados Epidemiológicos Clássicos.....	44
4.4 Teste de Susceptibilidade a Fármacos.....	47
4.5 Genotipagem.....	49
4.5.1 Técnica de <i>Spoligotyping</i>	49
4.5.2 Técnica do RD ^{Rio}	55
4.5.3 Técnica de ERIC-PCR.....	56
4.5.4 Técnica de MIRU-VNTR.....	58
4.5.5 ERIC-PCR associado ao MIRU.....	61
5.0 Discussão.....	63
6.0 Conclusões.....	76
7.0 Referências Bibliográficas.....	79
8.0 Anexos.....	92
8.1 Parecer Consubstanciado.....	
8.2 Ficha de Notificação / Investigação Tuberculose.....	

CAPÍTULO II

Produção Bibliográfica.....	95
-----------------------------	----

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da Tuberculose

A história da tuberculose (TB) é antiga, datada de antes do início da história documentada. Presume-se que o gênero *Mycobacterium* originou-se há mais de 150 milhões de anos (DANIEL, 2006). O uso de técnicas moleculares modernas e o sequenciamento de diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, permitiram uma estimativa mais precisa do período em que se originou o gênero (ACOSTA, 2010). É provável, no entanto, que os membros do complexo *M. tuberculosis*, incluindo as suas variantes *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. Canetti* e *M. bovis*, tenham tido um ancestral africano comum há 35.000-15.000 anos (GUTIERREZ et al., 2005).

Através dos conhecimentos atuais, baseados em evidências arqueológicas e históricas, os primeiros registros da TB humana ocorreram em múmias egípcias, há mais de 5000 anos a. C., as quais apresentavam anormalidades típicas do comprometimento vertebral pela TB (o Mal de Pott), e presença de material genético do *M. tuberculosis* em seus tecidos (DANIEL, 2000). Endêmica na Antiguidade era conhecida pelos egípcios, gregos, árabes e pelos povos do oriente. Permaneceu como uma doença sem importância durante o feudalismo, até sua explosão como a “grande peste branca” da urbanização capitalista do século XIX. Disseminou-se pelo mundo todo com o colonialismo e a expansão comercial (MELO, 1996). Em várias civilizações antigas as doenças eram consideradas como castigo divino. Coube a Hipócrates o entendimento de que a TB era uma doença natural, e passou a denominá-la tísica (significa “se consumir, definhar”). Os médicos romanos, por volta de 200 a.C., acreditavam que a TB era contagiosa e Galeno (131 - 200

d.C.) afirmava que a doença podia ser adquirida através da respiração do “ar pútrido dos doentes” (SOUZA et al., 2005).

No Brasil, até seu descobrimento, não havia relato de TB entre os nativos e acredita-se que aqui tenha sido introduzida pelos colonos portugueses e jesuítas (DIETZE; HADAD; PEREIRA, 2009). A chegada dos negros, desnutridos e alocados em senzalas insalubres, facilitou ainda mais a expansão da TB no Brasil. Um quinto dos doentes internados em hospitais, em 1855, sofria de TB e a mortalidade na segunda metade do século XIX ficava em torno de 700 por 100 mil habitantes (MELO, 1996). O contato permanente dos doentes com os índios proporcionou o adoecimento e a morte de muitos nativos (CAMPOS; PIANTA, 2001). No entanto, a TB assumiu condição de epidemia na população indígena, somente a partir da colonização européia (DANIEL, 2000; RUFFINO-NETTO, 2002), determinando consequências econômicas, e sociais para a sociedade brasileira até os dias atuais (GERALDES SANTOS et al., 2007).

A história da TB mudou dramaticamente, quando Robert Koch em 1882, identificou o *M. tuberculosis* e demonstrou a sua transmissão através dos aerossóis em 1884 (DIETZE; HADAD; PEREIRA, 2009).

Na era pré-quimioterápica, havia pouco recurso de tratamento, sendo realizado com repouso, alimentação saudável e clima adequado (higienodietético). Assim, 50% dos pacientes morriam, 25% tornavam-se crônicos e 25% curavam-se espontaneamente (RESENDE, 2005; FUNASA, 2002).

A vacina BCG, obtida em laboratório entre 1908 e 1921, a partir de cepas atenuadas do *M. bovis*, foi amplamente utilizada após a Primeira Guerra

Mundial. É uma vacina barata, segura e produz respostas imunes humorais e celulares. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a vacina em países com alta prevalência e incidência da doença, pois protege contra as formas graves da TB (miliar e meníngea) (ACOSTA, 2010).

Entretanto, o marco do tratamento e do controle da TB ocorreu em 1944, quando se inicia a era do tratamento medicamentoso com o surgimento da estreptomicina, primeiro antibiótico tuberculicida. Em 1945 a isoniazida, descrita desde 1912, teve sua eficácia demonstrada (SOUZA et al., 2005), no entanto foi inserida no esquema terapêutico em 1952. Na sequência surgem novos antibióticos: em 1946 o ácido para-aminossalicílico, em 1952 a pirazinamida, a ciclosserina em 1956, a etionamida em 1957, a rifampicina e o etambutol em 1962 (SOUZA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2013). Com o início do uso da rifampicina e com a evolução dos esquemas terapêuticos, houve a redução do tempo de duração do tratamento, passando de 24 meses (1944) para seis meses (1979), o que pode ter contribuído, em parte, para a maior adesão ao tratamento medicamentoso (MACIEL et al., 2012).

O sucesso da quimioterapia no tratamento da TB levou as nações a acreditar que no fim do século XX a doença seria erradicada ou pelo menos confinada nos países pobres (SOUZA et al., 2005). Contudo, o sucesso terapêutico não foi acompanhado pelo controle da doença, conforme era esperado. Contrariamente, a TB ressurgiu como uma das principais doenças infecciosas no mundo contemporâneo, sendo declarada em 1993, pela OMS, como um grave problema de saúde global (SOUZA, 2006). O aumento do número de casos da doença se deve ao aumento da pobreza, da desigualdade

social, dos aglomerados sociais, do número de pacientes com AIDS e o surgimento de cepas resistentes a múltiplas drogas (OMS, 2009).

1.2 Situação Atual da Tuberculose

A TB é considerada um grande problema de saúde pública e a pobreza e a desigualdade social, são fatores que contribuem para a incidência desta doença. Ela provoca problemas de saúde entre milhões de pessoas a cada ano, sendo classificada como a segunda causa de morte por uma doença infecciosa em todo o mundo, depois do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (OMS, 2012; KESHAVJEE et al., 2008). Trata-se de uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *M. tuberculosis*, o qual acomete principalmente os pulmões (TB pulmonar), mas pode afetar outros órgãos (TB extrapulmonar). A transmissão ocorre através de aerossóis presentes no ar, eliminados pela tosse de pacientes com TB pulmonar (OMS, 2012; KASPER et al., 2006). No entanto, uma proporção relativamente pequena de pessoas infectadas desenvolve a doença. Sendo as pessoas infectadas com o HIV, mais susceptíveis ao desenvolvimento da TB. A doença também é mais comum entre os homens do que entre as mulheres e afeta principalmente adultos nas faixas etárias economicamente produtivas (OMS, 2012).

Segundo dados recentes fornecidos pela OMS (2012), foram notificados no mundo quase 9,0 milhões de casos novos de TB em 2011. Entre estes, 82% se concentram em 22 países, e contribuem com 1,4 milhões de mortes (990 mil entre HIV negativos e 430 mil entre HIV positivos). Verificou-se também um intenso aumento na frequência de cepas do *M. tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas (MDR), contabilizando, por volta de 630 mil casos. Este fato representa uma ameaça que deve ser cuidadosamente avaliada, pois o

prolongamento da fase de transmissão possibilita que cepas resistentes, se tornem predominantes em várias partes do mundo (OMS, 2012; FARNIA et al., 2008).

A OMS declarou a TB como uma emergência global de saúde pública em 1993. A partir da década de 1990, os esforços para melhorar o atendimento e controle da TB foram intensificados a nível nacional e internacional (OMS, 2012).

No ano 2000, a Organização das Nações Unidas (ONU), ao analisar os maiores problemas mundiais, estabeleceu oito *Objetivos de Desenvolvimento do Milênio* (ODM), que no Brasil são chamados de “oito Jeitos de Mudar o Mundo”. A tuberculose está contemplada no 6º objetivo intitulado: combater a aids, a malária e outras doenças (BRASIL, 2012).

O Plano Global para o Combate da Tuberculose 2011-2015 (*The Global Stop Tuberculosis 2011-2015*) proposto pela OMS tem como missão livrar o mundo da TB. Seu objetivo é reduzir drasticamente a carga da doença até 2015, de acordo com o que foi pactuado nos ODM (BRASIL, 2012).

O plano está dividido em seis componentes: 1- expandir a estratégia DOTS (*Direct Observed Treatment Strategy, Short-Course* – Tratamento Diretamente Observado, em português) com qualidade; 2- visar a co-infecção TB/HIV, TB multidroga resistente (TB MDR) e as necessidades de populações pobres e vulneráveis; 3- fortalecer o sistema de saúde baseado na atenção primária; 4- capacitar as pessoas com tuberculose e a sociedade civil organizada; 5- envolver todos os prestadores de serviços de saúde; 6- possibilitar e promover pesquisas (BRASIL, 2012). O Plano ainda apresenta, como principais metas: reduzir pela metade a incidência e a mortalidade por

tuberculose até 2015, comparados aos valores de 1990 e eliminar a tuberculose como problema de saúde pública até 2050 (BRASIL, 2012). Através destas estratégias, têm ocorrido grandes progressos na redução dos casos de TB e óbitos nas últimas duas décadas. A meta de 2015 dos ODM de deter e reverter a incidência da TB vem sendo alcançada, com a incidência de TB caindo globalmente por vários anos e declinando 2,2% entre 2010 e 2011 (OMS, 2012). Globalmente, a taxa de mortalidade por tuberculose caiu em 41% desde 1990 e o mundo está no caminho certo para atingir a meta global de reduzir em 50% essa taxa até 2015. As taxas de mortalidade e incidência estão caindo em todo mundo, e na maioria dos 22 países com maior foco da doença, que representam mais de 80% dos casos mundiais de TB (OMS, 2012). A doença tem sido considerada como prioridade pelo governo federal do Brasil desde 2003. Estando sempre contemplada nos programas de saúde, como no Pacto pela Saúde, Mais Saúde, Programação das Ações de Vigilância em Saúde, Pacto da Atenção Básica e, mais recentemente, na Agenda Estratégica da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) (BRASIL, 2013).

Dentre os 22 países com maior foco da doença no mundo, o Brasil em 1997 ocupava o 10º lugar, já em 1998 passou a ocupar o 13º lugar (RUFFINONETTO, 2002), em 2004 o 15º lugar (BRASIL, 2006), e em 2006 o 16º lugar e hoje o Brasil ocupa o 17º lugar no ranking, retratando uma melhora no panorama da doença (OMS, 2011; 2012; ASSIS; FIRMINO, 2010).

Em 2012 no Brasil, foram notificados 70.047 novos casos de TB, no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), o que equivale ao coeficiente de incidência (CI) de 36,1/100.000 habitantes (BRASIL, 2013). Através destes dados, o Ministério da Saúde revela que, a taxa de incidência

da TB no Brasil caiu 15,9% na última década, passando de 42,8/100.000 habitantes em 2001, para 36,1/100.000 habitantes em 2012 (BRASIL, 2013).

No Estado de Minas Gerais a incidência da TB também diminuiu ao longo destes anos. Em 2012 foram registrados 18,5 casos da doença para cada 100 mil habitantes, contra 34,6 casos em 2001 (redução de 47%). Na capital do estado (Belo Horizonte), foram registrados 30 casos da doença para cada 100 mil habitantes, em relação a 54,3 registrados em 2001 (redução 45%) (SINAN-WEB). Em Montes Claros, principal cidade do Norte de Minas Gerais, a incidência vinha aumentando até o ano de 2004, mas a partir do ano de 2005 tem diminuído ano a ano. No ano de 2012, a incidência da TB pulmonar no município foi de 15,1 casos por 100.000 habitantes, contra 54 casos em 2004 (redução 72%) (SINAN-WEB). Levando em consideração o tamanho do Estado de Minas Gerais, reduzir as condições da transmissibilidade da doença e suas manifestações, significa diminuir os indicadores nacionais subseqüentes (JUNIOR et al., 2006).

Com relação aos óbitos, a redução foi ainda maior. A taxa de mortalidade caiu 23,4% em uma década. O país registrou 3,1 óbitos para cada grupo de 100 mil habitantes em 2001, passando para 2,4 em 2010 (OMS, 2012).

A redução gradativa e marcante da incidência da doença no Brasil nos últimos 10 anos se deve, aos investimentos do governo federal em ações de controle da doença. Em 2002, os recursos destinados ao programa foram de US\$ 5,2 milhões, aumentando para US\$ 74 milhões em 2011. Fato que contribuiu significativamente para a diminuição do número de óbitos, e dos casos da doença em todo o território brasileiro (BRASIL, 2011).

Mesmo havendo tendência de queda dos dois indicadores, o Brasil ainda não conseguiu alcançar a meta, estipulada pela OMS – curar 85% dos casos novos bacilíferos e manter a taxa de abandono em até 5%. Em 2010, a proporção de cura foi de 73,4% e em 2011 alcançou-se 71,6% (BRASIL, 2013). Sendo assim, apesar dos avanços no controle da TB, a doença ainda preocupa as autoridades de saúde. No país, a TB representa a quarta causa de óbitos por doenças infecciosas e a primeira entre pacientes com AIDS (BRASIL, 2012). Por isso, o Ministério da Saúde (MS) estabeleceu como prioridades, para 2013, a ampliação do diagnóstico com implantação de nova tecnologia e o fortalecimento das ações de TB na atenção básica. O enfrentamento aos determinantes sociais da TB também, se consolidam como meta programática (BRASIL, 2013).

1.3 Região Norte de Minas Gerais

A região Norte de Minas pertence a uma das doze regiões do estado de Minas Gerais. É formada por 89 municípios, agrupados em sete microrregiões.

Montes Claros pertence à microrregião homônima e Mesorregião do Norte de Minas, localizando-se a norte da capital do estado (Belo Horizonte), distando desta cerca de 422 km. Ocupa uma área de 3.582,034 km², onde 38,7000 km² estão em perímetro urbano, e os 3.543,334 km² restantes constituem a zona rural (EMBRAPA, 2012). Em 2012 sua população foi contada pelo IBGE em 370.216 habitantes (IBGE, 2010). Montes Claros é o município mais populoso desta região, o sexto mais populoso de Minas Gerais e o 62^o de todo o país. Foi emancipada no século XIX, tendo há bastante tempo, a indústria e o comércio como importantes atividades

econômicas, sendo considerada um polo industrial regional. Atualmente é formada por dez distritos, sendo que é subdivida ainda em cerca de 200 bairros e povoados (GRANDE BRASIL, 2012). A economia de Montes Claros é diversificada pelas atividades agropecuárias, industriais e de prestação de serviços. Na área urbana, a distribuição espacial da população está diretamente relacionada à condição social dos moradores, gerando desigualdade econômica na cidade. Bairros localizados próximos ao centro possuem população com maior poder aquisitivo, enquanto que na periferia estão localizados os menos afortunados (LEITE; PEREIRA, 2005).

Na cidade existem seis hospitais gerais, sendo um público, dois privados e três filantrópicos. Exemplos de hospitais da cidade: o Aroldo Tourinho, Clemente de Faria (Universitário), Fundação Hospitalar Dilson de Quadros Godinho (São Lucas), Alpheu de Quadros e Santa Casa. A Santa Casa de Monte Claros, denominação comum do hospital Irmandade Nossa Senhora das Mercês é considerado como o maior estabelecimento de saúde da região do norte de Minas Gerais (JUSBRASIL, 2008). O Hospital Universitário Clemente de Faria (HUCF), da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes) é um serviço administrado exclusivamente com recursos do Sistema Único de Saúde (SUS). Atende à população do norte do Estado de Minas Gerais, Vale do Jequitinhonha e sul da Bahia. O HUCF é referência nessas regiões, principalmente para os casos de acidente provocados por animais peçonhentos, AIDS e TB. Realizam-se no HUCF sete mil internações e 120 mil consultas anualmente (QUADROS-COELHO et al., 2009).

O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) da longevidade em Montes Claros é de 0,787 (o brasileiro é 0,638), com expectativa de vida de 72,25 anos

(UFMS, 2005). O Índice de Desenvolvimento da Educação Básica (IDEB) médio entre as escolas públicas de Montes Claros (MG) era, no ano de 2009, de 4,85; valor acima ao das escolas municipais e estaduais de todo o Brasil, que é de 4,0% (BRASIL, 2011).

Considerada um polo universitário, Montes Claros (MG) também conta com a presença de duas universidades públicas e diversas faculdades privadas. Estas oferecem cursos nas diversas áreas e são representadas principalmente, pela Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES, 2011) e pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por meio do Instituto de Ciências Agrárias (ICA, 2011).

1.4 Identificação Fenotípica da Tuberculose

O diagnóstico presuntivo da tuberculose pode ser feito através de dados da história clínica e achados radiológicos, ainda assim o diagnóstico definitivo depende da baciloscopia e da cultura.

O diagnóstico microbiológico contempla a detecção e o isolamento da micobactéria, a identificação da espécie e/ou do complexo isolado, e a determinação da sensibilidade do micro-organismo aos medicamentos antituberculose. A realização de todas estas etapas, depende da situação clínico-epidemiológica do caso sob investigação e dos recursos laboratoriais disponíveis (DIRETRIZES PARA A TUBERCULOSE, 2004).

Reconhecidamente, a baciloscopia é o método prioritário, quer para o diagnóstico, quer para o controle do tratamento da TB. Desde que executada corretamente em todas as suas fases, ela permite detectar de 60% a 80% dos casos, com resultado em até 24 horas (BRASIL, 2013).

A cultura é considerada “padrão ouro” para o diagnóstico da TB e para a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos. No entanto, esse método pode levar dois meses para fornecer o resultado. É realizado somente em populações consideradas de maior risco de albergarem bacilos resistentes, como: pacientes com tratamento prévio; pessoas que vivem com HIV/AIDS; contatos sintomáticos de casos de TB resistente e populações consideradas especiais (pessoas privadas de liberdade, indígenas, entre outros) (BRASIL, 2013).

1.5 Ferramentas Moleculares

Ferramentas moleculares têm sido amplamente utilizadas para caracterizar isolados de *M. tuberculosis*, com o objetivo de melhorar a compreensão da epidemiologia da TB (ALLIX-BÉGUEE et al., 2008; CATTAMANCHI et al., 2006; CLARK et al., 2006; INIGO et al., 2007; LAMBREGTS-VAN et al., 2003).

A epidemiologia molecular utiliza concomitantemente técnicas de biologia molecular, que caracterizam o conteúdo nucleotídico e a epidemiologia clássica, que estuda a distribuição e os fatores determinantes da doença nas populações humanas (FOXMAN; RILEY, 2001). Os objetivos práticos da epidemiologia molecular são: identificar os micro-organismos responsáveis por doenças infecciosas, determinar sua rota de transmissão, identificar os genes responsáveis por sua virulência, resistência a fármacos e produção de antígenos relacionados a vacinas (LEVIN et al., 1999).

A epidemiologia molecular permite identificar o foco da doença (BENNETT et al., 2002; VAN DEUTEKOM et al., 2005) e os fatores de risco associados à sua transmissão (GLYNN et al., 2008; KILK et al., 2008; WEIS et

al., 2002). Avalia a eficiência dos programas de controle da doença, através da observação da dinâmica dos processos de *cluster* (grupos genéticos com 100% de similaridade) (DAHLE et al., 2007; GENG et al., 2002; INIGO et al., 2008; KUNIMOTO et al., 2004; LILLEBACK et al., 2001).

A técnica de *Spoligotyping* descrita por Kamerbeek et al. (1997), é baseada na amplificação *in vitro* de um único *locus* altamente polimórfico no genoma da bactéria, contendo múltiplas *direct repeats* (DRs). Esta técnica pode ser realizada, em laboratórios sem equipamentos sofisticados (para seqüenciamento). A subsequente hibridização diferencial dos produtos amplificados é realizada com oligonucleotídeos complementares às regiões espaçadoras variáveis, localizadas entre as DRs, que estão ligados em uma membrana (MOLHUIZEN et al., 1998). O método é simples, rápido e robusto, sendo utilizado em larga escala em inquéritos epidemiológicos. Assim, é considerado uma ferramenta de primeira linha, para o estudo da diversidade genética de isolados de *M. tuberculosis* (KANDUMA et al., 2003).

Dentre as famílias de *Spoligotyping* a *Latin American Mediterranean* (LAM) apresenta polimorfismos de sequência longa (LPSs) no seu genoma. Uma delas é uma deleção de aproximadamente 26.314Kb, resultando na perda ou alteração de pelo menos dez genes. Esta bactéria com deleção foi denominada RD^{Rio}. Esta linhagem foi encontrada em 61% dos isolados em *cluster* (grupo genético), na cidade do Rio de Janeiro (GIBSON et al., 2008; LAZZARINI et.al, 2007). Devido a alta prevalência de TB causada pela sub-linhagem RD^{Rio}, esta deleção pode estar relacionada com a potencialização da virulência, e/ou uma adaptação específica do patógeno, em relação a população susceptível (DAVID et.al., 2012; LAZZARINI et. al. 2007).

O *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC-PCR) foi originariamente desenvolvido, para a tipagem molecular de *M. tuberculosis*. Sendo que, essas seqüências podem estabelecer relações clonais entre diferentes linhagens de *M. tuberculosis*, mesmo dentro de grupos de cepas que apresentam perfis idênticos dentro da IS6110. A seqüência ERIC, é constituída por elementos repetitivos, de 126 pares de bases, distribuídos ao longo do cromossomo bacteriano. Foram inicialmente bem caracterizados, em bactérias Gram negativas, pertencentes à família Enterobacteriaceae. Sua posição no genoma bacteriano parece ser diferente, entre as espécies e entre cepas de uma mesma espécie (SECHI et al., 1998).

Um novo método denominado MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) baseado na reação em cadeia da enzima polimerase (PCR), caracterizado por unidades repetitivas em número variável de repetições (VNTRs), dentro do genoma do *M. tuberculosis*, tem-se demonstrado efetivo para a tipagem molecular desta micobactéria (YUN et al., 2009; KANDUMA et al., 2003). Cada isolado é caracterizado, de acordo com o número de cópias de unidades repetidas em 12 *loci* independentes, espalhados em todo o genoma. Este método tem sido avaliado por vários estudos, em diferentes contextos (MAZARS et al., 2001; SUPPLY et al., 2001; FROTHINGHAM; MEEKERO, 1998). Sendo considerado de alta resolução, rápido, capaz de comparar resultados entre diferentes laboratórios, com possibilidade de análise de alto rendimento (YUN et al., 2009). O MIRU-VNTR possibilita uma comparação entre linhagens de diferentes áreas geográficas. Proporciona o rastreamento da movimentação de linhagens individuais (SUPPLY et al., 2000; MAZARS et al., 2001; SUPPLY et al., 2001), a análise e a identificação de focos de

contágio na população. Podendo assim, avaliar métodos mais adequados para interromper a transmissão da doença (PANDOLFI et al., 2007).

A caracterização molecular de cepas de *M. tuberculosis* é particularmente útil, em estudos de surtos de infecções e em investigação epidemiológica, uma vez que, métodos fenotípicos de tipagem apresentam, um poder discriminatório limitado.

A técnica de *Spoligotyping*, em conjunto com as técnicas de ERIC-PCR e MIRU-VNTR, consiste em uma ferramenta poderosa para estudar a epidemiologia, a filogenia e a adaptabilidade dos bacilos da tuberculose, de acordo com o seu genótipo (KANDUMA et al., 2003).

O trabalho é de grande interesse em Saúde Pública uma vez que possibilitará compreender o fenômeno da transmissão e dos fatores de risco relacionados à tuberculose dentro da população em estudo, devido a inexistência destes dados na região. Diante do contexto atual e das condições favoráveis que o município fornece, este estudo visa conhecer o panorama da doença em Montes Claros (MG), auxiliando assim ações futuras que possibilitem o controle da doença, e conseqüentemente sua erradicação, afim de, atingir as metas propostas pela OMS.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a epidemiologia clássica e molecular da TB Pulmonar, em pacientes da Região Norte de Minas Gerais, no período de 2011 a 2012.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar os dados sócio-demográficos e clínicos dos pacientes com TB atendidos no HUCF, através dos dados epidemiológicos registrados no SINAN.
- Identificar através da técnica molecular de PCR o *M. tuberculosis*, a partir dos isolados clínicos dos pacientes com TB pulmonar.
- Determinar o perfil de susceptibilidade das cepas de *M. tuberculosis* isoladas, frente a isoniazida e a rifampicina.
- Avaliar a presença efetiva de grupos genéticos predominantes nesta região, utilizando as técnicas de *Spoligotyping*, ERIC-PCR e MIRU-VNTR.
- Verificar a presença da linhagem RD^{Rio} entre os isolados pertencentes a família LAM.
- Analisar a associação das técnicas de ERIC-PCR e MIRU-VNTR, para o estudo genotípico dos isolados clínicos.
- Correlacionar os dados da epidemiologia clássica com os dados da epidemiologia molecular.
- Organizar um banco de dados com as cepas de *M. tuberculosis* isoladas dos pacientes com TB pulmonar do norte de Minas Gerais,

que foram genotipadas através das técnicas *Spoligotyping*, RDRio, ERIC-PCR e MIRU-VNTR.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cuidados Éticos

Quanto ao aspecto ético, o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES, onde foi analisado sob o processo 1881 e aprovado (Anexo I).

3.2 Tipo de Estudo

O método escolhido para essa pesquisa baseou-se no problema a ser investigado, nos objetivos do estudo, além do tempo e do recurso disponível. Sendo assim, para o delineamento dessa pesquisa optou por realizar uma pesquisa de caráter observacional, quantitativo, transversal, e descritivo.

Segundo Vieira e Hossne (2003), a pesquisa observacional é aquela na qual os participantes da pesquisa não são sorteados para os respectivos grupos, porque já pertencem a eles antes do início da pesquisa.

A observação é uma estratégia de coleta de dados para conseguir informações e utiliza os sentidos na obtenção de determinados aspectos da realidade, não consistindo apenas em ver e ouvir, mas também em examinar fatos ou fenômenos que se deseja estudar. É um elemento básico de investigação científica, utilizado na pesquisa de campo e se constitui na técnica fundamental da antropologia, como abordado por Lakatos e Marconi (1999).

De acordo com Lakatos e Marconi (1999), a pesquisa quantitativa tem como propósito fornecer dados contáveis. É uma modalidade em que as variáveis predeterminadas são mensuradas, e expressas numericamente.

Seus resultados são analisados com o uso preponderante de métodos quantitativos, como afirma Appolinário (2004).

A pesquisa de caráter transversal refere-se ao retrato do entrevistado no exato momento da pesquisa, sendo realizada uma única vez (OLIVEIRA, 2002). Trata-se de um estudo em que se acompanha o comportamento de uma ou mais variáveis, em grupos de sujeitos que se encontram em momentos ou estratos diferentes (APPOLINÁRIO, 2004).

A pesquisa descritiva ainda se caracteriza pela padronização na coleta de dados, através de questionários e de uma observação sistemática (Gil, 2008).

3.3 Amostragem

A população foi composta por pacientes com suspeita de TB pulmonar, residentes na Região Norte de Minas Gerais, atendidos no Hospital Universitário Clemente de Faria (HUCF), da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.

3.4 Obtenção das Amostras Clínicas para Estudo Epidemiológico Clássico e Molecular

O diagnóstico de TB pulmonar foi suspeitado pelo histórico clínico do paciente, sendo a patologia confirmada pelo médico através do exame de imagem (Raio-x de tórax) e pelo diagnóstico laboratorial, através da baciloscopia do escarro ou lavado bronco-alveolar, realizada no Laboratório de Análises Clínicas do HUCF.

3.4.1 Colheita das Amostras Clínicas

Foram coletadas amostras clínicas, sempre que possível em triplicata (escarro ou lavado bronco-alveolar), de pacientes com suspeita de TB pulmonar. As amostras foram colhidas em frascos estéreis e encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do HUCF, onde foram realizadas as baciloscopias.

3.4.2 Baciloscopia

Todas as amostras clínicas foram submetidas à técnica da baciloscopia direta utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen, para a observação de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR). Esta etapa foi realizada pelo Laboratório de Análises Clínicas do HUCF.

3.4.3 Cultura e Isolamento

As amostras clínicas, após a realização da baciloscopia no Laboratório de Análises Clínicas HUCF, foram acondicionadas em caixa isotérmica e encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas das Faculdades Integradas Pitágoras de Montes Claros, onde foi realizada a descontaminação e a semeadura das amostras no meio de Ogawa (OK), segundo a técnica preconizada por Ogawa-Kudoh (KUDOH; KUDOH, 1974) utilizando uma solução de NaOH a 4%. Os tubos com o meio de Ogawa, semeados com as amostras clínicas, foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por até 60 dias.

3.5 Identificação dos Isolados Clínicos

A partir do processamento das amostras clínicas (escarro ou lavado bronco-alveolar), foram obtidos os isolados clínicos.

Os isolados clínicos foram encaminhados ao Laboratório de Micobacteriologia Prof. Dr. Hugo David, localizado no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista- UNESP, no campus de Araraquara-SP. Os isolados estavam em meio de cultura sólido (OK) em fase de crescimento exponencial, e foram submetidos a identificação molecular e a genotipagem pelas técnicas de Spoligotyping, RD^{rio}, ERIC-PCR e MIRU-VNTR.

3.5.1 Extração de DNA por Termólise

Os isolados clínicos obtidos foram, submetidos à extração de DNA através da termólise, segundo Miyata et al. (2011). Portanto uma alíquota da cultura micobacteriana, crescida em meio sólido, foi dissolvida em 300µL de tampão TE (10 mM Tris, 1mM EDTA pH 8.5). A solução foi colocada em um micro-tubo com tampa de trava e submetida a três ciclos de fervura a 100°C por 20 minutos seguido de congelamento a -20°C.

3.5.2 Identificação do *M. tuberculosis* pela Técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Após a extração, o DNA das micobactérias foi submetido à identificação, através da técnica de PCR segundo van Embden et al. (1993), para confirmar a presença do *M. tuberculosis*.

A reação foi realizada, empregando o par de oligonucleotídeos iniciadores *INS1* (CGTGAGGGCATCGAGGTGGC) e *INS2* (GCGTAGGCGGTGACAAA), que amplifica um fragmento de 245pb, específico do complexo *M. tuberculosis*, contido na seqüência de inserção IS6110.

Na amplificação, em linhas gerais, para o volume final da reação de 25,0µL, foram adicionados 21,0µL de “Master Mix” (PROMEGA® na diluição de

2 partes de PCR Master Mix 2x para 1 parte de água ultrapurificada), 1,0µL dos oligonucleotídeos iniciadores *INS1* e *INS2*, na concentração de 20µM e 2,0µL do DNA de cada amostra. A mistura reativa foi submetida a amplificação no termociclador, empregando o seguinte protocolo de ciclagem: 1 ciclo de 10 minutos à 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto à 94 °C, 2 minutos à 56 °C e 1 minuto a 72 °C, finalizando com 10 minutos à 72 °C e mantido sob refrigeração à 4 °C até o momento da revelação. O produto da PCR juntamente com 10µL de peso molecular (*ladder* Invitrogen®) em escala de 100 pares de bases foi submetido, à eletroforese utilizando uma cuba de eletroforese horizontal (Horizon 11.14 GIBCO®), acoplada a uma fonte de eletroforese (BIORAD®), empregando uma voltagem de 100 volts, por aproximadamente 3 horas, em gel de agarose a 1%, produzido com tampão TBE 1x e corado com brometo de etídio na concentração de 10µg/mL. A eletroforese foi fotodocumentada empregando o equipamento Alpha Imager – Alpha Innotech®. A presença de um produto de amplificação de 245 pares de base confirmou a identificação do complexo *M. tuberculosis*.

3.6 Genotipagem dos isolados clínicos de *M. tuberculosis*

Os isolados clínicos confirmados pela técnica de PCR, como sendo de *M. tuberculosis* foram, submetidos à genotipagem pelas técnicas de *Spoligotyping*, RD^{Rio}, ERIC-PCR e MIRU-VNTR.

3.6.1 Técnica de *Spoligotyping*

Esta técnica foi realizada segundo Kamerbeek et al. (1997). Para a amplificação das regiões espaçadoras entre as DR, foram utilizados os *primers* *DRa* (5'GGTTTTGGGTCTGACGAC3') e *DRb* (5'CCGAGAGGGGACGGAAAC3').

Para o volume final de 40 μ L, em cada reação foram adicionados, 36 μ L de Master Mix (PROMEGA®) na diluição recomendada pelo fabricante (1 parte de Master Mix 2x para 1 parte de água ultra-pura), 1,0 μ L [25pmoles] de cada oligonucleotídeo iniciador (*DRa* e *DRb*) e 2,0 μ L do DNA genômico extraído por termólise.

A amplificação em termociclador consistiu em 1 ciclo de 15 minutos a 95°C, 20 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 30 segundos a 72°C, finalizando com 1 ciclo de 5 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram mantidos à temperatura de 4°C até o momento do uso.

Para a revelação do produto amplificado, a membrana utilizada na hibridação foi previamente lavada por 5 minutos a 65°C com 250 mL da solução SSPE 2x SDS 0,1%, e posicionada sobre o suporte *cushion* no *miniblotter* (Immunetics®), de forma que os canais ficassem perpendiculares a sua aplicação, sendo então parafusada no *miniblotter*. Os resíduos de líquidos presentes em cada canal na membrana foram aspirados. Os produtos da PCR preparados anteriormente foram desnaturados, por 10 minutos a 100°C no termociclador, e colocados imediatamente no gelo. Cada um dos canais foi preenchido com 20 μ L do produto da PCR, diluído em 150 μ L de solução SSPE 2x SDS 0,1%, evitando a formação de bolhas. Os canais negativos foram preenchidos com 150 μ L de solução SSPE 2x SDS 0,1%.

O *miniblotter* foi incubado por 60 minutos a 60°C, na posição horizontal em forno de hibridização (*Amersham Biosciences*®) e sem agitação. Antes da remoção da membrana do *miniblotter*, todos os canais foram aspirados utilizando bomba a vácuo.

A membrana após duas lavagens de 10 minutos a 60°C, com 250 mL de solução SSPE 2x SDS 0,5% pré-aquecida, foi transferida para a garrafa específica do forno de hibridização (*Rolling bottle*) até seu resfriamento. Adicionou-se então à membrana, 10 mL de solução SSPE 2x SDS 0,5% com 10µL de estreptavidina conjugada com peroxidase (GE *Healthcare*®), incubando-a no forno de hibridização a 42°C por 45 a 60 minutos. Após esse processo, a membrana foi novamente submetida a duas lavagens com 250 mL da solução SSPE 2x SDS 0,5%, por 10 minutos a 42°C e duas lavagens com 250mL da solução SSPE 2x, por 5 minutos à temperatura ambiente e incubada novamente por 1 minuto com 20 mL da mistura ECL (GE *Healthcare*®), retirando-se o excesso de líquido em papel. A membrana, coberta com plástico PVC, foi colocada em cassete, e numa sala escura foi exposta ao filme de raio-x (Kodak®) por 30 minutos, seguindo as instruções do fabricante.

As marcas reveladas no filme de raio-X, foram analisadas e lidas de 3 em 3 espaçadores, onde para cada espaçador é atribuído um valor (4, 2 e 1 respectivamente). Em presença dos espaçadores, os valores foram somados, por exemplo, se o isolado apresentou os 3 espaçadores o valor total foi 7, se o isolado não apresentou o segundo espaçador o valor foi 5, e a interpretação foi 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 SITVITWEB, que é uma versão atualizada do banco de dados SpolDB4.0 (BRUDEY et al., 2006), disponível em <http://www.pasteur->

guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/. Com o auxílio do SpolDB4.0 e do SITVITWEB, os spoligotipos foram agrupados em famílias e subfamílias.

3.6.2 Técnica do RD^{Rio}

Para a identificação dos isolados pertencentes a linhagem RD^{Rio}, foram selecionados todos os que pertenciam a família LAM de *Spoligotyping*. Para tal, os isolados clínicos foram selecionados e submetidos a PCR multiplex (LAZZARINI et al., 2007). Para a amplificação foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores.

O primeiro par (5'GACCTGACGCCGCTGACAC3' e 5'CACCTACACCGCTTCCTGCC3'), tem como alvo a região do IS1561 que localiza-se internamente a região de deleção RD^{Rio}, um marcador dos isolados *Wild Type* (WT), com fragmento de 530 pares de base (pb).

A outra região que designa a deleção RD^{Rio}, foi amplificada pelos oligonucleotídeos iniciadores que promoveram a formação de um fragmento de 1175 pares de base (5'CACTCCGGCTGCCAATCTCGTC3' e 5'CACCGCCACGCTGAATGAGACCA3').

Para o volume final de 40µL em cada reação, foram utilizados 36µL de Master Mix (PROMEGA®), na diluição recomendada pelo fabricante (1 parte de Master Mix 2x para 1 parte de água ultra-pura), 1,0µL [25pmoles] de cada oligonucleotídeo iniciador (2 pares) e 2,0µL do DNA genômico.

A amplificação em termociclador consistiu em 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 4 minutos a 72°C, finalizando com 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram mantidos à temperatura de 4°C até o momento do uso.

O produto da PCR juntamente com 10 μ L de peso molecular (*ladder* Invitrogen[®]) em escala de 100 pares de bases foi submetido à eletroforese utilizando uma cuba de eletroforese horizontal (Horizon 11.14 GIBCO[®]), acoplada a uma fonte de eletroforese (BIORAD[®]) empregando uma voltagem de 100 volts, por aproximadamente 3 horas, em gel de agarose a 1%, produzido com tampão TBE 1x e corado com brometo de etídio na concentração de 10 μ g/mL. A eletroforese foi fotodocumentada empregando o equipamento Alpha Imager – Alpha Innotech[®].

3.6.3 Técnica de ERIC-PCR

Para a realização desta técnica, utilizou-se o protocolo padronizado por Sechi et al. (1998), com a utilização de um par de oligonucleotídeos iniciadores ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC) e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG).

Para o volume final de 30 μ L, em cada reação foram adicionados, 22 μ L de Master Mix (PROMEGA[®]) na diluição recomendada pelo fabricante (1 parte de Master Mix 2x para 1 parte de água ultra-pura), 1,0 μ L [25pmoles] de cada oligonucleotídeo iniciador (ERIC1R e ERIC2), 3 μ L de DMSO e 3 μ L do DNA genômico.

O protocolo de ciclagem para as reações de ERIC-PCR consiste, na incubação de 2 minutos a 94C^o, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 94C^o, 1 minuto a 52C^o e 10 minutos a 70C^o e uma extensão final a 70C^o por 20 minutos.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese utilizando uma cuba de eletroforese horizontal (Horizon 11.14 GIBCO[®]) acoplado a uma fonte de eletroforese (BIORAD[®]) empregando uma voltagem de 100 volts, por

aproximadamente 3 horas em gel de agarose a 2%, produzido com tampão TBE 1x e corado com brometo de etídio na concentração de 10µg/mL. A eletroforese foi fotodocumentada empregando o equipamento Alpha Imager – Alpha Innotech®.

O número e os tamanhos dos fragmentos foram avaliados, com auxílio do programa de bioinformática denominado Bionumerics 4.61 (*Applied Maths*®), para a confecção de um dendrograma onde foi possível analisar a formação de grupos genéticos com isolados que apresentarem qualquer grau de similaridade.

3.6.4 Técnica de MIRU-VNTR

Foi empregada a técnica de MIRU-VNTR, segundo Supply (2000; 2001; 2006). Inicialmente foram utilizados 12 pares de oligonucleotídeos iniciadores (02, 04, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40), para cada um dos 33 isolados clínicos (Tabela 1).

Empregando a técnica manualmente foi realizada uma reação PCR para cada região de cada amostra. As misturas reativas de PCR para os *loci* de MIRU-VNTR foram preparadas em tubos de 200µL. Em cada tubo foram adicionados 10,35µL de água ultra pura estéril; 2,1µL de 10x PCR buffer; 1,7µL da solução de 25mM de MgCl₂; 1,6µL de cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 4µM; 10% de DMSO; 0,4µL do mix de dNTPs na concentração de 10mM; 0,15µL de rTAQ na concentração de 5U/µL e 1µL de DNA 0,02µg/µL concentrado, totalizando volume final de 21µL.

Foi empregado um único protocolo de ciclagem para as reações de PCR. Este protocolo consistiu em: um ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido de

40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, seguidos de 10 minutos a 72°C para alongação final.

O produto da PCR juntamente com 10µL de peso molecular (*ladder* Invitrogen®) em escala de 100 pares de bases foi submetido, à eletroforese utilizando uma cuba de eletroforese horizontal (Horizon 11.14 GIBCO®), acoplado a uma fonte de eletroforese (BIORAD®), empregando uma voltagem de 100 volts, por aproximadamente 3 horas em gel de agarose a 1,5%, produzido com tampão TBE 1x e corado com brometo de etídio na concentração de 10µg/mL. A eletroforese foi fotodocumentada empregando o equipamento Alpha Imager – Alpha Innotech®.

Após a genotipagem completa de todos os isolados, os dados foram inseridos em um programa de bioinformática denominado Bionumerics 4.61(AppliedMaths®) para a confecção de um dendrograma, onde foi possível analisar a formação de grupos genéticos com isolados que apresentarem qualquer grau de similaridade.

Tabela 1: Desenho dos 12 pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) empregados na técnica de MIRU-VNTR.

Locus	Oligonucleotídeos
MIRU 2	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAT
MIRU 4	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGTCAGC
MIRU 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
MIRU 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTA CTTGTA
MIRU 23	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTGTC
MIRU 24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
MIRU 26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG
MIRU 27	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
MIRU 31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT
MIRU 39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
MIRU 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGTGATCTCGGCGAAATCAGATA

Fonte: Supply et al. (2006)

3.7 Correlação Epidemiológica Clássica e Molecular

Para confrontar os resultados obtidos, pela epidemiologia molecular realizada com o auxílio das técnicas de *Spoligotyping*, RD^{fluo}, ERIC-PCR e MIRU-VNTR, foram utilizadas informações clínico-epidemiológicas dos pacientes com TB pulmonar do Norte de Minas Gerais, atendidos no HUCF no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.

As informações clínico-epidemiológicas foram obtidas, através dos dados epidemiológicos, registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e fornecidos pelo setor de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde de Montes Claros (MG).

As variáveis analisadas foram as sócio-demográficas (sexo, faixa etária, escolaridade, etnia e local de residência) e clínicas (forma da doença, tipo de entrada, baciloscopia, raio-x do tórax, agravos associados e situação de encerramento).

Após serem obtidas as informações, foi construído um banco de dados para que estes fossem tabulados, e analisados por meio de métodos descritivos e estatísticos. As variáveis foram analisadas, e comparadas através do software estatístico SPSS versão 18, para assim traçar as características epidemiológicas da doença.

3.8 Teste de Susceptibilidade aos Fármacos

O teste de susceptibilidade aos fármacos foi realizado nos isolados clínicos de *M. tuberculosis*, sendo este, realizado em triplicata, usando a técnica do REMA (*Resazurin Microtiter a Assay*) segundo Palomino et al. (2002) e; Von Groll et al. (2010), e as drogas de referência isoniazida (INH), e rifampicina (RMP) (Sigma - Aldrich™, Steinheim, Germany).

A técnica consiste em uma microdiluição em placa empregando a resazurina como revelador da sensibilidade bacteriana às drogas, sendo determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do agente antimicobacteriano capaz de inibir até 90% da população bacteriana, *in vitro*.

Os fármacos utilizados no estudo (INH e RMP) foram preparados em solução estoque de $10 \mu\text{g/mL}$ e conservados em -80°C até o momento do uso. Foram realizadas diluições seriadas das soluções dos fármacos em meio Middlebrook 7H9 (Difco™, Detroit, MI, USA) em uma microplaca de 96 orifícios, de maneira a se obter concentrações variadas de INH e RMP (1 a $0,01 \mu\text{g/mL}$).

Para o preparo das suspensões bacilares, um raspado da cultura (no meio OK), proveniente dos isolados clínicos de *M. tuberculosis*, correspondente a aproximadamente 5 mg de peso seco, foi dissolvido em água estéril até obtenção de uma suspensão comparável com a escala nº 1 de McFarland (10^7 UFC/mL) Após o ajuste, as suspensões foram diluídas na proporção 1:25 em meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) para obtenção da concentração bacilar de 10^5 UFC/mL (unidade formadora de colônia/mL).

Nas colunas da microplaca, uma diluição seriada dos fármacos foi realizada conforme citada anteriormente. O primeiro orifício da microplaca contendo cada fármaco a ser analisado foi utilizado para controle de contaminação, onde foram adicionados apenas o meio de cultura e o fármaco, onde é esperado não haver crescimento bacteriano. Volume de 100 µL da diluição de 1×10^5 UFC/mL foi inoculado em cada um dos orifícios contendo as soluções dos fármacos nas concentrações estabelecidas. A microplaca foi selada com parafilme e incubada a 37°C. Após sete dias de incubação foi adicionado, o volume de 30 µL da resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich™, Steinheim, Germany) diluída em água estéril em toda a placa. A microplaca foi reincubada a 37°C por 24 horas, e em seguida foi realizada a leitura. Após este período, foi realizada a leitura visual e a interpretação da fluorescência no SpectraFluor Plus (TECAN®; filtros: 530nm de excitação e 590nm de emissão). A análise da leitura da placa foi realizada com auxílio de uma planilha do Excel para a determinação da CIM. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir a multiplicação de 90% das células de *M. tuberculosis*.

4.0 RESULTADOS

4.1 Diagnóstico Laboratorial

A partir da análise das amostras clínicas (escarro ou lavado broncoalveolar) de 345 pacientes, foi verificado que, 320 (92,8%) apresentaram a baciloscopia negativa, e 25 (7,2%) apresentaram a baciloscopia positiva.

Em relação à cultura das amostras clínicas no meio de OK, 312 (90,4%) pacientes apresentaram cultura negativa e 33 (9,6%) apresentaram cultura positiva. Dos 33 pacientes que apresentaram a cultura positiva, 25 (75,8%) apresentaram a baciloscopia positiva e 08 (24,2%) a baciloscopia negativa. Assim, a baciloscopia apresentou menor sensibilidade para o diagnóstico da TB, em relação a cultura, com uma positividade de 75,8%, comparada com outros estudos.

4.2 Diagnóstico Molecular

Dos 33 isolados clínicos obtidos submetidos a identificação pela técnica de PCR/*IS6110*, 100% foram identificados como sendo *M. tuberculosis*, onde a positividade para o *IS6110* foi evidenciada, pelo aparecimento de banda nítida de 245pb no gel de agarose a 1% (Figura 1).

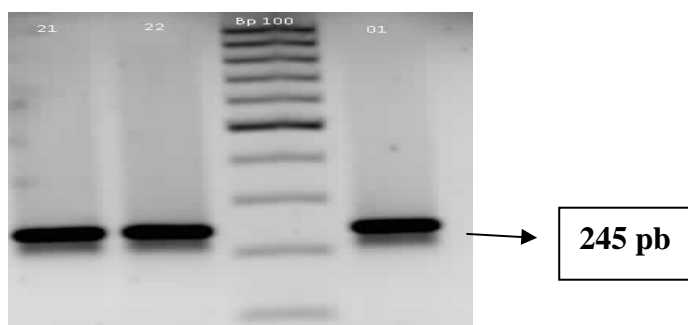


Figura 1: Gel de agarose a 1% para confirmação molecular dos isolados de *M. tuberculosis*, utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores INS1 e INS2 apresentando um fragmento de 245pb, um marcador de peso molecular (100pb).

4.3 Dados Epidemiológicos Clássicos

No período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012, dos 345 pacientes avaliados, somente 33 (9,6%) apresentavam a TB pulmonar. Em relação à frequência da doença segundo os anos de análise, em 2011 foram avaliados 157 pacientes com suspeita da TB pulmonar, atendidos no HUUCF, dos quais 138 (87,9%) não apresentavam a doença, e 19 (12,1%) apresentavam a doença. No entanto, em 2012 foram analisados 188 pacientes, onde 174 (92,6%) não apresentavam a doença e 14 (7,4%) apresentavam a doença. Sendo assim, podemos perceber uma redução de 4,7% na frequência da TB pulmonar, entre os anos de 2011 e 2012.

Quanto à procedência dos pacientes com TB pulmonar, atendidos no HUUCF, 69,7% dos pacientes, eram naturais da cidade de Montes Claros, 12,1% de Varzelândia, 3,03% de Espinosa, 3,03% de Itacarambi, 3,03% de Santa Bárbara, 3,03 de São Francisco e 3,03% de Novo Horizonte (Tabela 2) (Figura 2).

Em relação à análise dos dados epidemiológicos sócio-demográficos dos 33 pacientes com TB, 75,8% pertenciam ao sexo masculino e 24,2% ao sexo feminino. A faixa etária variou de 19 a 86 anos, predominando a idade entre 40 a 59 anos (42,5%), e a idade entre 20 a 39 anos (36,4%) (Gráfico 1). Houve predominância da etnia parda (60,6%), seguida pela etnia branca (27,3%) e preta (3,0%) (Tabela 3). No que diz respeito ao grau de escolaridade, 42,4% dos pacientes apresentavam baixa escolaridade, onde 33,3% deles relataram ter o ensino fundamental incompleto e 9,1% eram analfabetos (Tabela 3)

Tabela 2: Procedência dos Pacientes com TB Pulmonar Atendidos no HUCF.
Montes Claros, Minas Gerais, 2011 – 2012.

CIDADE	FREQUÊNCIA	PERCENTUAL
ESPINOSA	1	3,03%
ITACARAMBI	1	3,03%
MONTES CLAROS	23	69,7%
SANTA BARBARA	1	3,03%
SAO FRANCISCO	1	3,03%
JANAÚBA	1	3,03%
NOVO HORIZONTE	1	3,03%
VARZELÂNDIA	4	12,1%
Total	33	100

Fonte: SINAN/Secretaria Municipal de Saúde de Montes Claros

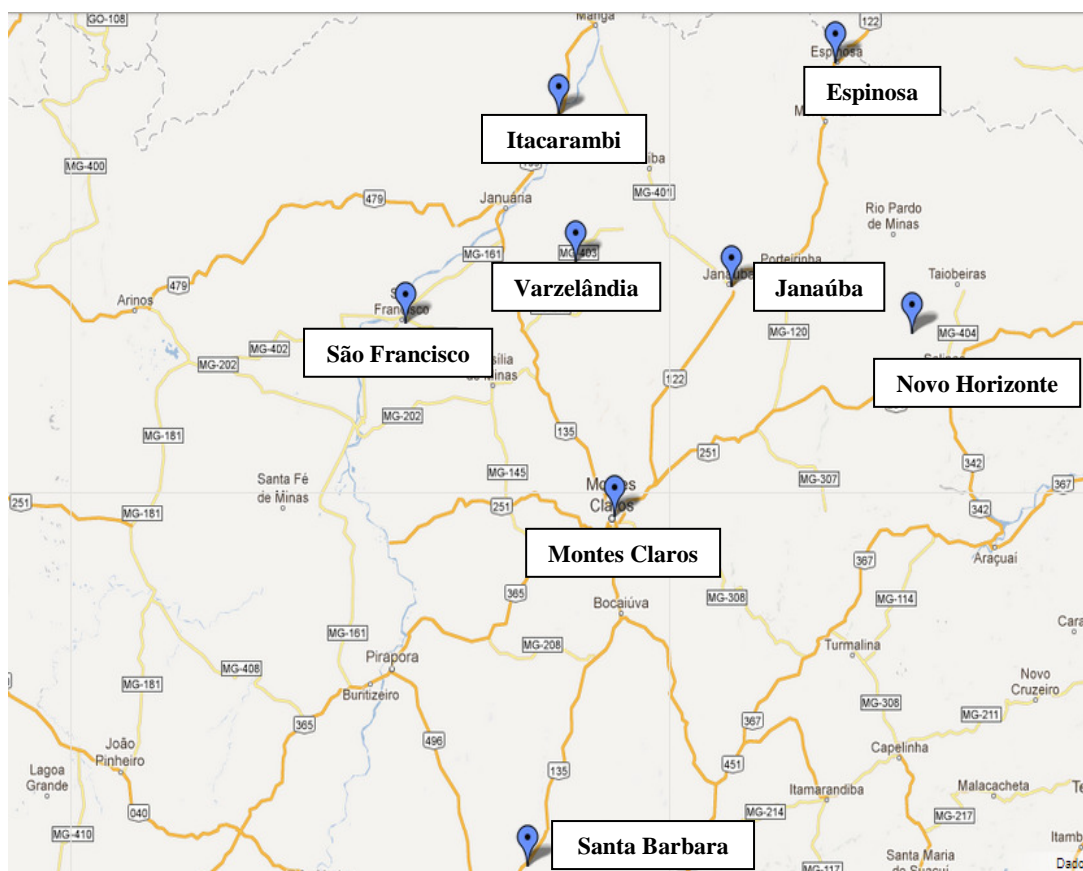


Figura 2: Mapa construído usando Google Maps® contendo todas as cidades do Norte de Minas Gerais presentes neste estudo.

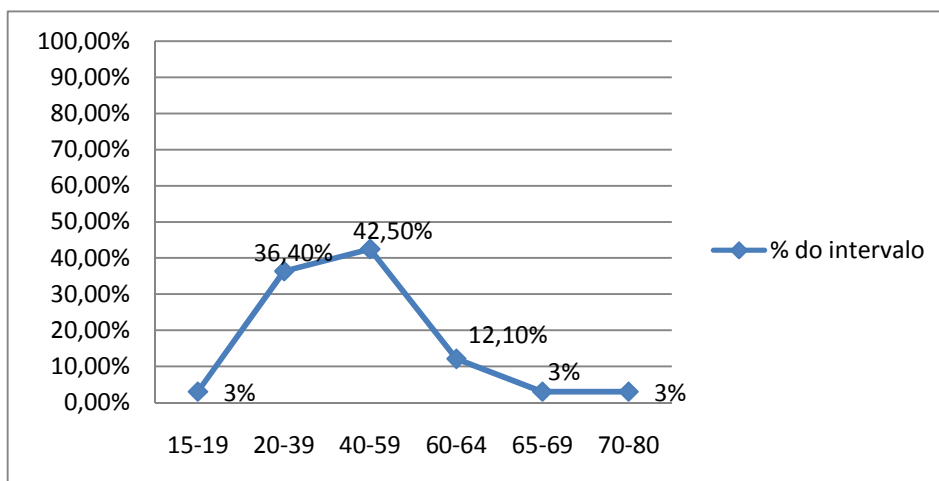


Gráfico 1: Porcentagem das Idades dos Pacientes com Tuberculose Pulmonar atendidos no HUCF, 2011-2012.

Com referência aos dados epidemiológicos clínicos dos pacientes com TB, quanto ao tipo de entrada, 69,7% eram de casos novos, 9,1% de recidivas, 9,1% de transferências e 3,1% não souberam responder. Em 100% dos casos, foi realizada a baciloscopia do escarro para o diagnóstico da TB, sendo 74,8% com resultado positivo e 24,2% negativo. Em relação à condição de encerramento dos casos de TB, 30,3% evoluíram para cura, em 30,3% ocorreu a transferência para tratamento em outros municípios, 3,0% ocorreu o óbito em decorrência de outras causas e em 36,6% dos casos os dados se encontravam ignorados ou em branco (Tabela 3).

De acordo com os agravos associados, 6,1% dos pacientes se encontravam co-infectados com o vírus HIV e 24,25% eram alcoolistas. Vale salientar que a informação sobre estas variáveis não estavam disponíveis (ignorado/branco) em 33,3% e 24,2% dos casos respectivamente (Tabela 4).

Todos os 33 pacientes com TB avaliados foram, tratados com o esquema terapêutico atualizado (INH, RIP, EMB e PZA), sendo que, 42,4% foram submetidos ao tratamento supervisionado (TS/TDO) (Tabela 4).

4.4 Teste de Susceptibilidade a Fármacos

Em relação ao teste de susceptibilidade a fármacos realizado pela técnica do REMA, 27 (81,8%) cepas de *M. tuberculosis* analisadas foram sensíveis aos dois fármacos testados (INH e RFP), no entanto 06 (18,2%) isolados foram resistentes a INH.

Tabela 3: Dados Epidemiológicos clássicos sócio-demográficos e clínicos dos pacientes com tuberculose pulmonar. Montes Claros, Minas Gerais, 2011 - 2012.

Parâmetros	Pacientes HUCF 2011/2012
Total das Notificações	33
Sexo	
Masculino	25 (75.8%)
Feminino	08 (24.2%)
Idade (anos)	
10-14	00 (0.0%)
15-19	01 (3.0%)
20-39	12 (36.4%)
40-59	14 (42.4%)
60-64	04 (12.1%)
65-69	01 (5.0%)
70-79	00 (0.0%)
> 80	01 (3.0%)
Etnia	
Ignorado	02 (6.0%)
Branca	09 (27.4%)
Preta	02 (6.0%)
Amarela	00 (0.0%)
Parda	20 (60.6%)
Escolaridade	
Ignorado	11 (33.3%)
Analfabeto	03 (9.1%)
Fund. incomp.	11 (33.3%)
Fund. comp.	01 (3.0%)
Médio incomp.	02 (6.1%)
Médio comp.	03 (9.1%)
Superior	02 (6.1%)
Tipo de Entrada	
Novo	23 (69.7%)
Recidiva	03 (9.1%)
Reingresso aban.	00 (0.0%)
Transferência	03 (9.1%)
Não sabe	01 (3.1%)
Baciloscopia	
Positiva	25 (75.8%)
Negativa	08 (24.2%)
Não realizada	00 (0.0%)
Situação de Encer.	
Ignorado/branco	12 (36.4%)
Cura	10 (30.3%)
Abandono	00 (0,0%)
Óbito TB	00 (0,0%)
Óbito outros	01 (3.0%)
Transferência	10 (30.3%)

Tabela 4: Agravos Associados aos Pacientes com Tuberculose Pulmonar e Tratamento Supervisionado (DOTS). Montes Claro, Minas Gerais, 2011 - 2012.

Parâmetros	Pacientes HUCF 2011/2012
HIV/AIDS	
Sim	02 (6.1%)
Não	20 (60.6%)
Ignorado/branco	11 (33.3%)
Alcoolismo	
Sim	08 (24.25%)
Não	17 (51.5%)
Ignorado/branco	08 (24.25%)
TS/DOTS	
Sim	14 (42.4%)
Não	10 (30.3%)
Ignorado/branco	09 (27.3%)
Total	33

Fonte: SINAN / Secretária Municipal de Saúde de Montes Claros

4.5 Genotipagem pelas técnicas de, Spoligotyping, RD^{Rio}, ERIC-PCR e MIRU-VNTR

4.5.1 Técnica do *Spoligotyping*

Através da técnica de *Spoligotyping* foram analisados os 33 isolados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes do Norte de Minas Gerais. Os 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 o banco de dados SITIVIT2.

A análise dos perfis genéticos obtidos com os dados presentes no SITVIT2 permitiu, a identificação de 22 perfis genéticos distintos (diversidade genética de 66,7%), com a formação de 3 famílias, 10 subfamílias e 19 SIT (*Shared International Type*) distintos. Dentre os perfis genéticos encontrados 15 (45,5%) pertencem a família LAM (*Latin American and Mediterranea*), 04 (18,2%) a família T, 01 (3,0%) a família H (*Haarlen*), 08 (24,2%) ao perfil U (*undesigned*) e 03 (9,1%) foram designados como “órfãos” (perfis não presentes no banco de dados SITVIT2 ou perfis novos) (Tabela 5 e 6).

Dos 15 isolados classificados na família LAM (45,5%), 06 pertence a subfamília LAM9, dos quais 05 (83,3%) foram agrupados no SIT 42 e 01 (16,5%) no SIT 435.

A segunda família mais incidente nesse estudo foi a família T com 06 isolados (18,2%), onde a subfamília T2 com 04 isolados (12,2%) foi a mais frequente, apresentando 2 diferentes SITs (1302 e 52). Outros perfis como T1 (SIT 51), T1 (SIT 244), LAM1 (SIT 20), LAM2 (SIT 17), LAM3 (SIT 125), LAM3 (SIT 1491), LAM4 (SIT 60), LAM4 (SIT 828), LAM6 (SIT 64) e H3 (*Haarlem*) (SIT 512), apresentaram uma baixa frequência nesse estudo, sendo encontrado somente 01 isolado de cada perfil (Tabela 5 e 6).

Com os perfis genéticos encontrados, foi construído um dendrograma utilizando o software Bionumerics versão 4.61 (Applied Maths). Os 22 perfis genéticos distintos encontrados, foram agrupados em 6 *clusters* (6 grupos genéticos com 100% de similaridade com os mesmos SITs), no entanto, 16 isolados apresentaram perfis únicos (Figura 3). Os *clusters* continham 2, 3 ou 6 isolados e representaram 51,5% dos isolados

Pela análise dos 22 perfis genéticos foi verificado que, os perfis pertencentes a família LAM estão presentes nos 8 municípios do Norte de Minas (Epinosa, Itacarambi, Montes Claros, Santa Bárbara, São Francisco, Janaúba, Novo Horizonte e Varzelândia). Esta ampla distribuição da família LAM, além de ser a mais freqüente no estudo, está presente em todo o Norte de Minas Gerais. Por outro lado os perfis pertencentes a família T e os perfis U estavam presentes somente no município de Montes Claros (Tabela 6).

Quanto a distribuição geográfica dos spoligotipos encontrados neste estudo, todos os perfis apresentam distribuição ubiqüitária com exceção de três novos perfis descritos (órfãos) e o perfil LAM9 (SIT 435), que foi descrito anteriormente somente no Brasil e Estados Unidos (Tabela 5).

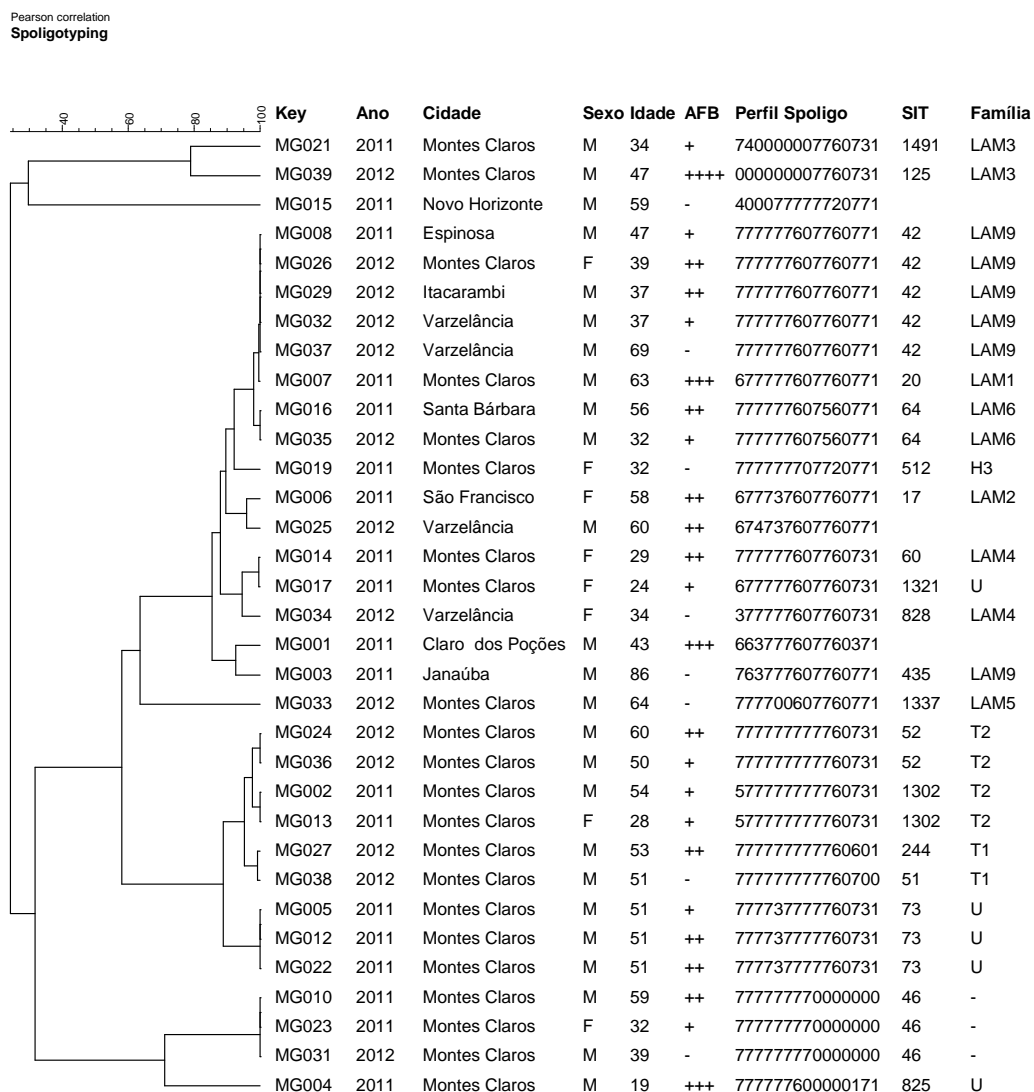


Figura 3: Dendrograma de *Spoligotyping* construído com auxílio do programa Bionumerics[®] utilizando correlação de Pearson com 33 isolados.

4.5.2 Técnica RD^{Rio}

Os 15 isolados pertencentes a família LAM foram submetidos a técnica de PCR multiplex para identificação da deleção RD^{Rio}. Destes, 10 (66,7%) dos isolados eram RD^{Rio} e 05 (3,3%) *Wild Type* (WT) ou seja, sem a deleção específica. Entre os isolados classificamos na linhagem RD^{Rio}, 50% eram resistentes a INH. Os genótipos WT foram sensíveis aos quimioterápicos (Tabela 7).

Dentro das subfamílias LAM, a presença da deleção RD^{Rio} foi verificada na subfamília LAM9 em 5 isolados (33,3%), sendo 4 pertencentes ao SIT42 e 1 ao SIT 435. Também em outros isolados da família LAM (LAM1, LAM2, LAM4 e LAM5), apresentaram o genótipo RD^{Rio}. Nas subfamílias LAM3, LAM6, bem como em um isolado da subfamília LAM9 (SIT 42), foi verificado o genótipo WT (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados dos isolados pertencentes a família LAM que foram classificados nas sublinhagem RD^{Rio} ou WT (Wild Type)

Nº do isolado	SIT	Subfamília	Nº isolados no grupo	RD ^{Rio} / WT	Susceptibilidade a	
					INH	RIP
MG007	20	LAM1	1	RD ^{Rio}	S	S
MG006	17	LAM2	1	RD ^{Rio}	S	S
MG039	125	LAM3	1	WT	S	S
MG021	1491	LAM3	1	WT	S	S
MG014	60	LAM4	1	RD ^{Rio}	S	S
MG034	828	LAM4	1	RD ^{Rio}	R	S
MG033	1337	LAM5	1	RD ^{Rio}	R	S
MG016	64	LAM6		WT	S	S
MG035	64	LAM6	2	WT	S	S
MG008	42	LAM9		RD ^{Rio}	S	S
MG029	42	LAM9		RD ^{Rio}	R	S
MG032	42	LAM9		RD ^{Rio}	R	S
MG037	42	LAM9	5	RD ^{Rio}	R	S
MG026	435	LAM9		RD ^{Rio}	S	S
MG026	42	LAM9	1	WT	S	S

S: sensível / R: resistente

4.5.3 Técnica de ERIC-PCR

A genotipagem pela técnica do ERIC-PCR, dos 33 isolados clínicos provenientes do Norte de Minas Gerais, promoveu a formação de 33 perfis distintos, indicando um elevado grau de polimorfismo entre os isolados, não havendo formação de grupos genéticos com 100% de similaridade. No entanto, 18 (54,5%) isolados foram agrupados em 09 grupos com mais de 96% de similaridade, denominados E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 e E9. Sendo que, 06 isolados (18,2%) apresentaram 99,% de similaridade, 06 (18,2%) apresentaram 98% de similaridade, 04 (12,1%) apresentaram 97% de similaridade, e 02 (6,0%) apresentaram 96% de similaridade (Tabela 8).

A figura 4 representa um dendrograma construído pelo software Bionumerics com os 33 diferentes perfis de *M. tuberculosis*, obtidos com a técnica do ERIC. O dendrograma mostra as relações genéticas entre os diferentes perfis e a identificação dos 09 grupos com mais de 96% de similaridade genética (E1 a E12). As bandas amplificadas variaram em tamanho de 140 a 2kb.

Tabela 8: Grupos genéticos com similaridade superior a 90% obtidos ERIC-PCR.

Grupo Genético	Nº Isolados	Amostras	Similaridade
E1	02	MG005, MG006	99%
E2	02	MG033, MG034	99%
E3	02	MG035, MG036	99%
E4	02	MG14, MG15	98%
E5	02	MG 12, MG 25	98%
E6	02	MG023, MG031	98%
E7	02	MG024, MG038	97%
E8	02	MG002, MG004	97%
E9	02	MG019, MG017	96%

(33 entries)

Pearson correlation (0.0%-100.0%)
ERIC

ERIC

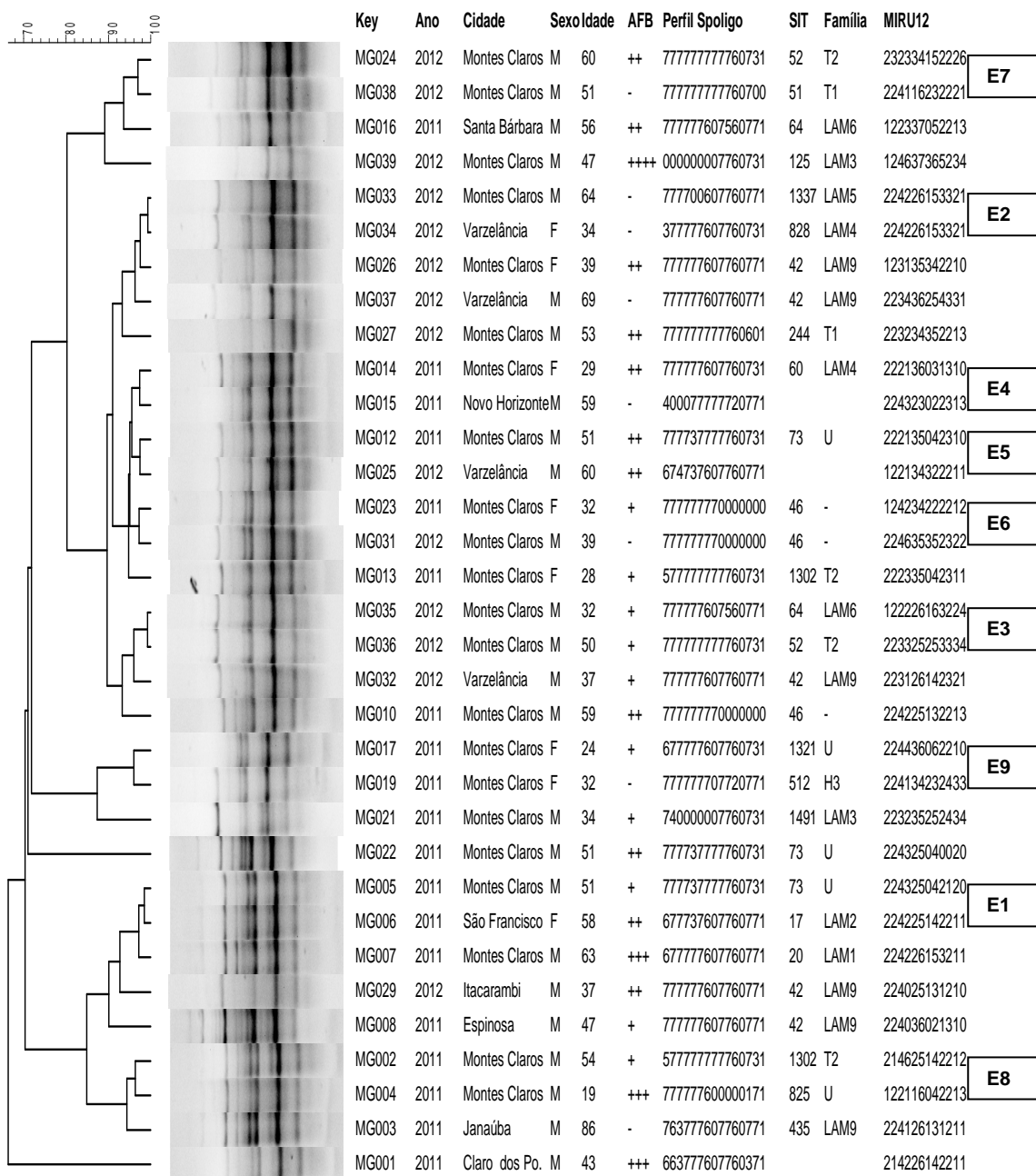


Figura 4: Dendrograma de ERIC-PCR construído com auxílio do programa Bionumerics[®], utilizando correlação de Pearson com 33 isolados.

4.5.4 Técnica do MIRU-VNTR

Os resultados da genotipagem dos 33 isolados clínicos, pela técnica do MIRU-VNTR12 *loci* (2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 30, 39 e 40) estão apresentados na Tabela 9.

A análise dos 33 isolados clínicos, pela técnica de MIRU-VNTR, indica que não houve formação de grupos genéticos com 100% de similaridade. No entanto, 16 (48,5%) isolados foram agrupados em 08 grupos genéticos com similaridade superior a 90%, denominados M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 e M8. Sendo que, 02 isolados (6,06%) apresentaram 99,% de similaridade, 02 (6,06%) apresentaram 98% de similaridade, 06 (18,2%) apresentaram 96% de similaridade, 02 (6,06%) apresentaram 95% de similaridade, 02 (6,06%) apresentaram 91% de similaridade, e 02 (6,06%) apresentaram 90% de similaridade (Tabela 10).

A figura 5 representa um dendrograma construído pelo software Bionumerics com os 33 diferentes perfis de *M. tuberculosis*, obtidos com a técnica do MIRU-VNTR. O dendrograma mostra as relações genéticas entre os diferentes perfis e a identificação dos 08 grupos com mais de 90% de similaridade genética (M1 a M8).

Tabela 9: Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles.

ALELOS												
AMOSTRA	M02	M04	M10	M16	M20	M23	M24	M26	M27	M31	M39	M40
MG001	2	1	4	2	2	6	1	4	2	2	1	1
MG002	2	1	4	6	2	5	1	4	2	2	1	2
MG003	2	2	4	1	2	6	1	3	1	2	1	1
MG004	1	2	2	1	1	6	0	4	2	2	1	3
MG005	2	2	4	3	2	5	0	4	2	1	2	0
MG006	2	2	4	2	2	5	1	4	2	2	1	1
MG007	2	2	4	2	2	6	1	5	3	2	1	1
MG008	2	2	4	0	3	6	0	2	1	3	1	0
MG010	2	2	4	2	2	5	1	3	2	2	1	3
MG012	2	2	2	1	3	5	0	4	2	3	1	0
MG013	2	2	2	3	3	5	0	4	2	3	1	1
MG014	2	2	2	1	3	6	0	3	1	3	1	0
MG015	2	2	4	3	2	3	0	2	2	3	1	3
MG016	1	2	2	3	3	7	0	5	2	2	1	3
MG017	2	2	4	4	3	6	0	6	2	2	1	0
MG019	2	2	4	1	3	4	2	3	2	4	3	3
MG021	2	2	3	2	3	5	2	5	2	4	3	4
MG022	2	2	4	3	2	5	0	4	0	0	2	0
MG023	1	2	4	2	3	4	2	2	2	2	1	2
MG024	2	3	2	3	3	4	1	5	2	2	2	6
MG025	1	2	2	1	3	4	3	2	2	2	1	1
MG026	1	2	3	1	3	5	3	4	2	2	1	0
MG027	2	2	3	2	3	4	3	5	2	2	1	3
MG029	2	2	4	0	2	5	1	3	1	2	1	0
MG031	2	2	4	6	3	5	3	5	2	3	2	2
MG032	2	2	3	1	2	6	1	4	2	3	2	1
MG033	2	2	4	2	2	6	1	6	3	3	2	1
MG034	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1
MG035	1	2	2	2	2	6	1	6	3	2	2	4
MG036	2	2	3	3	2	5	2	5	3	3	3	4
MG037	2	2	4	1	1	6	2	3	2	2	2	1
MG038	2	2	3	4	3	6	2	5	4	3	3	1
MG039	1	2	4	6	3	7	3	6	5	2	3	4

Tabela 10: Grupos genéticos com similaridade superior a 90% obtidos MIRU-VNTR

Grupo Genético	Nº Isolados	Amostras	Similaridade
M1	02	MG033, MG034	99%
M2	02	MG006, MG007	98%
M3	02	MG003, MG029	96%
M4	02	MG012, MG014	96%
M5	02	MG035, MG036	96%
M6	02	MG005, MG022	95%
M7	02	MG002, MG031	91%
M8	02	MG004, MG016	90%

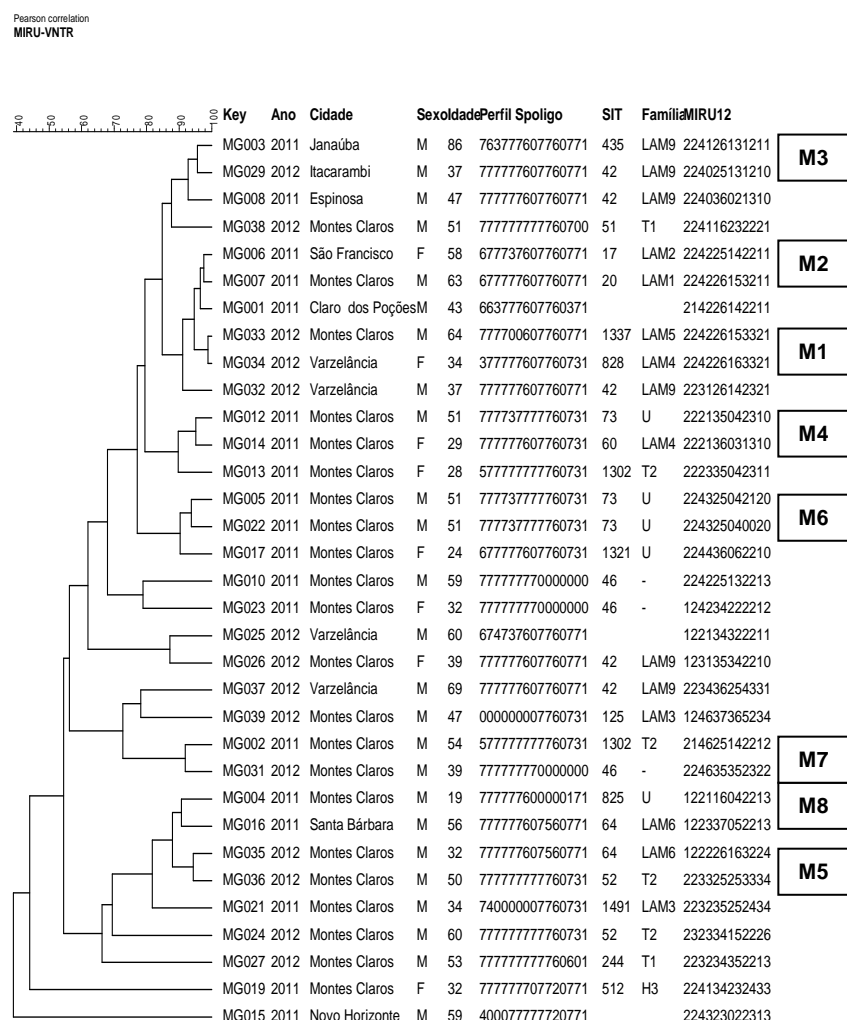


Figura 5: Dendrograma de MIRU-VNTR construído com auxílio do programa Bionumerics[®], utilizando correlação de Pearson com 33 isolados.

4.5.5 ERIC-PCR associado ao MIRU-VNTR

A associação das técnicas ERIC-PCR e MIRU-VNTR na genotipagem dos 33 isolados clínicos promoveu, a formação de 06 grupos polimórficos com mais de 90% de similaridade, denominados EM1, EM2, EM3, EM4, EM5, EM6, envolvendo 12 (26,4%) isolados. Sendo que, 02 isolados (6,1%) apresentaram 99,% de similaridade, 02 (6,06%) apresentaram 98% de similaridade, 02 (6,06%) apresentaram 97% de similaridade, 02 (6,06%) apresentaram 95% de similaridade, e 04 (12,1%) apresentaram 91% de similaridade (Tabela 11).

Quando a técnica de ERIC e de MIRU foram avaliadas, isoladamente foi verificado que a técnica de ERIC formou 09 grupos genéticos com similaridade acima de 90%. Já a técnica de MIRU formou 08 grupos genéticos com similaridade acima de 90%. Destaca-se que, o grupo genético formado pelos isolados MG033 e MG034, e o grupo formado pelos isolados MG035 e MG036 foram identificados por ambas as técnicas. Os resultados podem indicar que as técnicas de ERIC e MIRU apresentam sensibilidade, para discriminar a diversidade genética.

A figura 6 representa um dendrograma construído pelo software Bionumerics com os 33 diferentes perfis de *M. tuberculosis*, obtidos com a associação das técnicas do ERIC-PCR e MIRU-VNTR. O dendrograma mostra as relações genéticas entre os diferentes perfis e a identificação dos 06 grupos com mais de 90% de similaridade genética (EM1 a EM6).

Tabela 11: Grupos genéticos com similaridade superior a 90% obtidos com a associação entre ERIC-PCR e MIRU-VNTR

Grupo Genético	Nº Isolados	Amostras	Similaridade
EM1	02	MG033, MG034	99,0%
EM2	02	MG006, MG007	98,0%
EM3	02	MG035, MG036	97,0%
EM4	02	MG012, MG014	95,0%
EM5	02	MG003, MG029	91,0%
EM6	02	MG025, MG026	91,0%

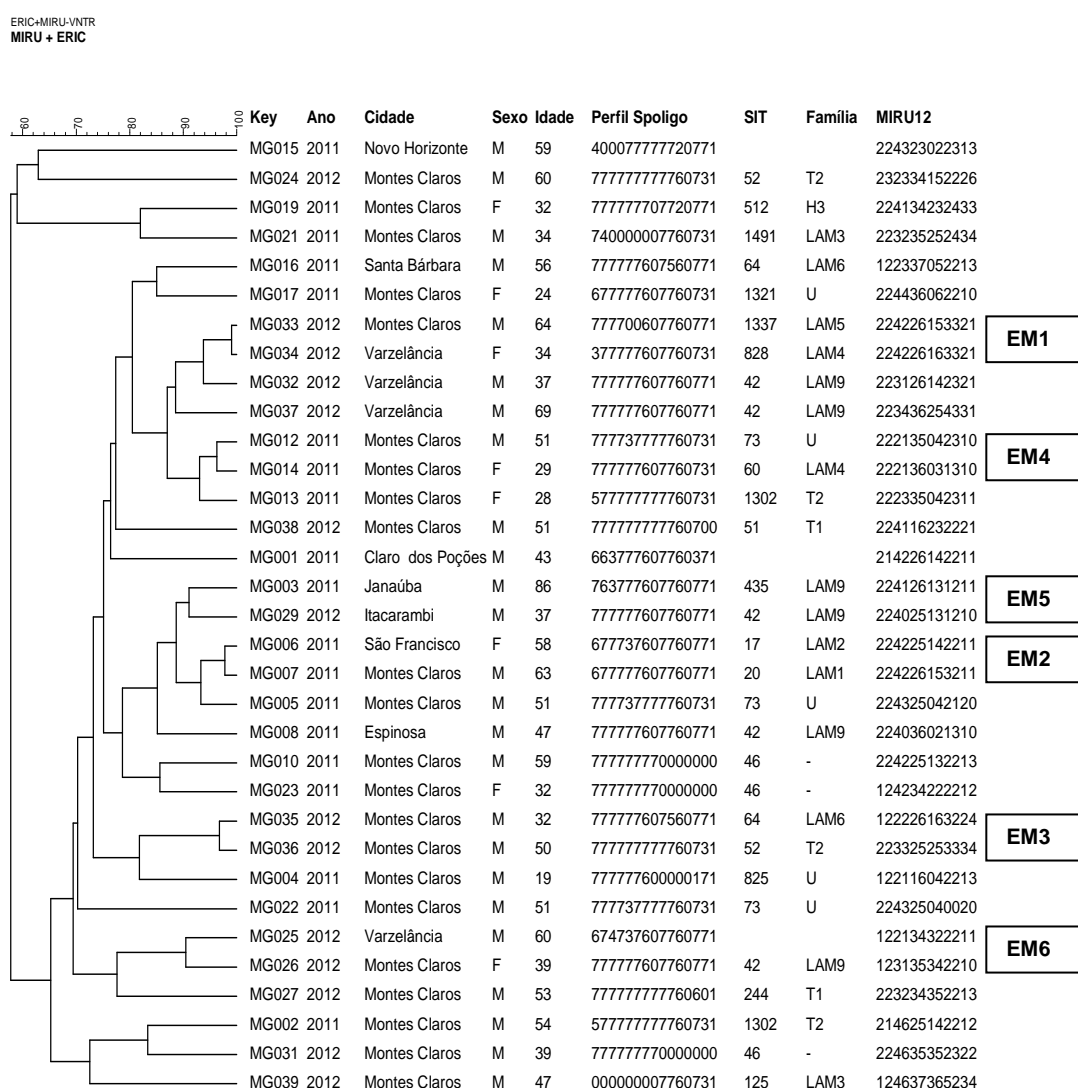


Figura 6: Dendrograma de ERIC-PCR associado ao MIRU-VNTR construído com auxílio do programa Bionumerics®, utilizando correlação de Pearson com 33 isolados.

5.0 DISCUSSÃO

A tuberculose é considerada uma das mais antigas doenças infecciosas da humanidade e, embora passível de um efetivo tratamento, permanece na atualidade como um importante problema de saúde pública mundial, em virtude da ampla dispersão geográfica, emergência de casos multirresistentes e coinfeção com HIV (SAN PEDRO; OLIVEIRA, 2013).

Analisando as amostras clínicas (escarro ou lavado bronco-alveolar) de 345 pacientes, suspeitos de TB pulmonar atendidos no HUCF, pela baciloscopia utilizando a técnica de Ziehl Neelsen e da cultura em OK, foi verificado que, a baciloscopia detectou 25 casos de TB e a cultura 33 casos. Todas as 33 amostras positivas, foram submetidas a identificação molecular pela amplificação do transposon IS6110, que permitiu confirmar todas como sendo *M. tuberculosis*.

Apesar da baciloscopia demonstrar uma sensibilidade inferior a da cultura, para o diagnóstico da TB, a taxa encontrada no estudo (75,8%), se assemelha a registrada no país (73,7%) em 2012 (BRASIL, 2013). Atualmente a baciloscopia é a técnica mais utilizada, para o diagnóstico e controle do tratamento da doença no Brasil. No entanto, a cultura mesmo apresentando uma maior sensibilidade para o diagnóstico da TB, ela só é recomendada para populações consideradas de maior risco de albergarem um bacilo resistente, pois pode levar até dois meses para fornecer o resultado.

Na tentativa de solucionar este problema, o MS pretende implantar na rede pública de saúde, a partir do segundo semestre de 2013, o teste rápido para diagnóstico da TB. Esse teste utiliza técnicas de biologia molecular (PCR em tempo real), para identificar o DNA do *M. tuberculosis*, permitindo seu

diagnóstico em apenas duas horas. A proposta do MS é substituir a baciloscopia pelo teste rápido, para o diagnóstico da TB em toda rede de atenção, e assim aumentar o número de casos identificados e seu diagnóstico oportuno, proporcionando a quebra da cadeia de transmissão e o controle da doença (BRASIL, 2013).

Em relação à frequência da doença segundo os dois anos de análise, em 2011 foram avaliados 157 pacientes com suspeita da TB pulmonar, atendidos no HUCF, dos quais 138 (87,9%) não apresentavam a doença, e 19 (12,1%) apresentavam a doença. No entanto, em 2012 foram analisados 188 pacientes, onde 174 (92,6%) não apresentavam a doença e 14 (7,4%) apresentavam a doença. Sendo assim, podemos perceber uma redução de 4,7% na frequência da TB pulmonar, entre os anos de 2011 e 2012.

Neste sentido, de acordo com o número de notificações de TB pulmonar no município em 2011, que foi de 92 casos, sendo 71 casos novos e em 2012 que foi de 77, sendo 56 novos casos (SINAN), o HUCF foi responsável por cerca de 18,2 a 20,7% das notificações da doença no município, no período analisado.

Foi averiguado que a incidência da doença no município diminuiu 25% de 2011 para 2012 (20,2 casos/100 mil habitantes em 2011, contra 15,1 em 2012), segundo os dados do SINAN. Sendo assim, percebe-se que juntamente com a redução da taxa da doença em Montes Claros, houve a redução dos casos diagnosticados entre os pacientes atendidos no HUCF (4,7%). A redução dos casos de TB que tem ocorrido em todo o território brasileiro nos últimos anos deve-se, a implantação de políticas de saúde pública instituídas no país a partir de 2003, que priorizaram a redução dos casos da doença.

De acordo com a procedência dos pacientes com TB pulmonar atendidos no HUCF, 69,7% eram naturais de Montes Claros e 30,3% de outras cidades do Norte de Minas Gerais. O HUCF é um hospital vinculado a Universidade Estadual de Montes Claros, sendo administrado com recursos do SUS. Atende à população do norte do Estado de Minas Gerais, Vale do Jequitinhonha e sul da Bahia, sendo referência nessas regiões, para TB. Por isso, foi verificado que 30,3% dos pacientes com TB atendidos no hospital, não eram de Montes Claros e sim procedentes de outras cidades localizadas no Norte de Minas Gerais.

Entre os casos de TB estudados, a doença predominou no sexo masculino. Resultados similares foram obtidos por Augusto et al. (2013) e Santos et al. (2013).

A faixa etária variou de 19 a 86 anos, predominando a idade entre 40 a 59 anos (42,5%), e a idade entre 20 a 39 anos (36,4%). Situação semelhante foi encontrada por outros pesquisadores no Brasil (BRASIL, 2006) e em outras cidades, como São Paulo-SP (BIERRENBACH et al., 2007) e Salvador-BA (XAVIER; BARRETO, 2007). Assim, a doença tem afetado pessoas em fase economicamente produtiva, o que pode acarretar um desequilíbrio econômico das famílias ao exigir o afastamento do paciente de seu trabalho, mesmo que por um determinado período, enquanto ele for bacilífero (BRASIL, 2010 b).

Houve predominância da etnia parda em relação às demais com 60,6% dos pacientes notificados, seguida pela etnia branca com 27,3% (Tabela 3), o que condiz com o estudo de Medeiros et al. (2012). A influência da etnia sobre a susceptibilidade à infecção e desenvolvimento da doença tem sido descrita por outros estudos (KWIATKOWSKI, 2000). Recentemente, foi sugerido que

diferentes grupos étnicos apresentam uma susceptibilidade diferenciada, em relação a determinadas cepas de *M. tuberculosis* (GAGNEUX et al., 2006).

No que diz respeito ao grau de escolaridade, 42,4% dos pacientes apresentavam baixa escolaridade. Esse achado corrobora com os dados obtidos no estudo de Paixão e Gontijo (2007) e de Jesus et al. (2012). O baixo grau de escolaridade é reflexo de todo um conjunto de condições sócio-econômicas precárias, que aumentam a vulnerabilidade à doença, sendo, responsáveis por uma maior incidência da TB e por um menor acesso a informações sobre a cadeia de transmissão da doença. Isto pode justificar a demora do paciente na busca por atendimento e uma menor adesão ao tratamento (SILVEIRA; ADORNO; FONTANA, 2007; MASCARENHAS et al., 2005).

No presente estudo, como também no de Medeiros, Pretti e Nicole (2012), verificamos um predomínio de casos novos (69,7%), entre o total de casos notificados. Nota-se que, com o passar do tempo, a detecção de casos novos vem aumentando, e isso auxilia no tratamento precoce, diminuindo as tendências para prevalência, incidência e mortalidade; porém, outras medidas precisam ser adotadas para se conseguir alcançar as metas da OMS (GUIMARÃES et al., 2012). Para uma efetiva redução dos casos novos, é necessário o desenvolvimento de um processo que identifique áreas com diferentes necessidades e ações, nas quais o programa de controle da TB irá investir na busca de pacientes sintomáticos respiratórios, e na identificação de população de risco para a TB latente. Ao se identificar, e tratar corretamente esses casos ocorrerá, uma redução real do número de casos novos (AUGUSTO et al., 2013).

Analisando a situação de encerramento da doença podemos observar que 30,3% dos casos evoluíram para cura, 30,3% dos casos foram transferidos para tratamento em outros municípios e 3,0% evoluíram para óbito em decorrência de outras causas.

A proporção de cura demonstrada neste estudo infelizmente se encontra abaixo dos valores relatados em outros estudos (MENDES et al., 2007; PRINCE et al., 2013), das taxas nacionais (73,4% em 2010 e 71,6% em 2011) (BRASIL, 2013) e do que é preconizado pela OMS (85% de cura). No entanto, 36,4% dos dados em relação a situação de encerramento encontravam-se ignorados ou em branco, e 30,3% eram de pacientes provenientes de outras localidades, que foram transferidos para tratamento em seu município. Estes fatores influenciaram, na realização de uma análise mais precisa em relação a este desfecho.

Em relação ao percentual de transferência (30,3%), foi verificado um valor superior ao encontrado na literatura (8,1%). A elevada porcentagem de transferências favorece o aumento do número de abandono e reduz a quantidade de pacientes curados, o que dificulta o controle da doença (BRASIL, 2010 b).

As co-morbidades são importantes fatores de risco para a ocorrência de formas clínicas mais graves, de difícil diagnóstico da doença (GONÇALVES, 2009). Neste estudo a taxa de co-infecção TB/HIV foi de 6,1%. Esta taxa se assemelha a encontrada no estudo realizado em Belém (PA), por Paz et al. (2012) (5,75%), e se encontra abaixo da taxa nacional divulgada em 2012 (9,7%) (BRASIL, 2013) e da divulgada no estudo de Noguti et al. (2010) (9,3%).

Em relação ao alcoolismo, os dados indicam que cerca de 1/4 dos casos de TB eram de pacientes alcoolistas. Estudos demonstram que a porcentagem de pacientes alcoolistas com TB no Brasil, é representada por 25% (PAIXÃO; GONTIJO, 2007), o que corrobora com os dados relatados no estudo em questão. De acordo com o que é mencionado nesta pesquisa e também em outros estudos, o alcoolismo mantém uma associação significativa com a TB, pois o consumo crônico do álcool proporciona debilidade imunológica, desnutrição e fragilidade social, desta forma, o organismo torna-se vulnerável a instalação e desenvolvimento da doença, nestes pacientes (MENEZES et al.,1998; PAIVA et al., 2011).

A maior prevalência de co-morbidades, como alcoolismo e a infecção pelo HIV, mostra a necessidade de um acompanhamento por uma equipe de multiprofissionais devido à possibilidade de um agravamento das doenças, além de ações, como o TDO, nas unidades básicas de saúde para evitar o abandono, e o desenvolvimento de TB multiresistente (PRADO et al., 2011; BAKER et al., 2011).

Todos os pacientes com TB desse estudo foram tratados com o esquema terapêutico atualizado (INH, RIP, EMB e PZA), sendo que, 42,4% foram submetidos ao tratamento supervisionado (TS/TDO) (Tabela 4). Em 2010 no Brasil, entre 46,8 a 50,6% dos pacientes com TB realizaram o TDO. O tratamento supervisionado é uma importante ferramenta para a adesão terapêutica dos pacientes com TB, é indicado para pessoas com mais de 60 anos, em mau estado geral, com necessidades de hospitalização, alcoolistas, soropositivas para o HIV, sob uso concomitante de medicamentos

anticonvulsivantes, e pessoas que possuem alterações hepáticas (BRASIL, 2010).

No que se refere, ao tratamento da TB, muitos desafios são encontrados, como a dificuldade de adesão ao tratamento, ampliação da estratégia TDO com qualidade, descentralização dos programas, ampliação do acesso e expansão da cobertura do programa para toda a rede básica, dentre outros.

Por isso, a OMS estabeleceu algumas metas de resolutividade: detectar 70% dos casos estimados, curar 85% dos casos notificados e reduzir o abandono do tratamento a menos de 5%. Ainda, como meta do milênio, a OMS tem por objetivo reduzir pela metade as mortes e a prevalência da TB até 2015, através da estratégia *Stop TB* (VENDRAMINI et al., 2007)

Assim, são necessários um trabalho conjunto envolvendo profissionais de saúde, gestores, a sociedade civil e seus segmentos organizados na luta contra a TB, para que ocorra: a ampliação da estratégia TDO, o gerenciamento da comorbidade tuberculose/HIV e de TB MDR e o conhecimento da distribuição da doença no país.

Analisando o teste de susceptibilidade a fármacos realizado pela técnica do REMA, 06 (18,2%) cepas de *M. tuberculosis* analisadas foram resistentes a INH. A INH, desde o seu descobrimento em 1952, é o fármaco de primeira linha mais amplamente usado para o tratamento da tuberculose. O *M. tuberculosis* na sua forma ativa é altamente susceptível à INH. Entretanto, na sua forma latente (não replicante) ou sob condições anaeróbicas, o bacilo é resistente (ZHANG; YEW, 2009). A resistência à INH ocorre na frequência de 1 em 10^{5-6} bacilos *in vitro* (WINDER, 1982). Essa resistência é associada

principalmente com mutações ou deleções no gene *katG* (ZHANG et al. 1992), que são responsáveis por 60-80% da resistência.

Até pouco tempo atrás, era quase impossível identificar cepas individuais de *M. tuberculosis* e, em consequência, acompanhar a transmissão de uma determinada cepa numa região e/ou instituição. Nos últimos anos, os métodos tradicionais de coleta epidemiológica de dados têm sido complementados por métodos de genotipagem (BORGES et al., 2004).

No entanto, a epidemiologia molecular da tuberculose, ainda é escassa no Brasil (MALAGNI *et al.*, 2009; MALASPINA *et al.*, 2008). Assim, há necessidade de novos estudos na área, que possibilitem a avaliação da diversidade genética dos isolados de *M. tuberculosis* e da sua distribuição, permitindo assim, a avaliação de infecção recente ou infecção tardia em populações de risco, facilitando e aumentando os dados da diversidade genética das cepas de *M. tuberculosis* no Brasil.

A fim de caracterizar a diversidade genética da população de *M. tuberculosis*, proveniente de isolados clínicos de pacientes residentes no Norte de Minas Gerais, foram utilizadas as técnicas de *Spoligotyping*, RD^{Rio}, ERIC-PCR e MIRU-VNTR.

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 (FILLIOL et al., 2002 e 2003) bem como a proveniência geográfica de cepas isoladas (DAVID et al., 2004).

Pela técnica de *Spoligotyping* foi verificado nesse estudo, uma diversidade genética de 66,7%, com o predomínio das famílias LAM (45,5%), T (18,2%) e H (3,0%). Essa diversidade genética é respaldada por ampla mistura étnica presente entre os habitantes da Região Norte de Minas Gerais. As famílias LAM, T e H mais observadas nesse estudo, são famílias muito freqüentes encontradas na África, na América Central e do Sul, e na Europa (BRUDEY et al., 2006). Dados semelhantes foram encontrados no estudo realizado por Gomes et al. (2012), em 11 estados brasileiros (LAM 46%, T 18,6% e H 12,2%); no estudo realizado por Miranda et al. (2011) em Minas Gerais (LAM 55,3%, T 10,5% e H 7%); no realizado por Mendes et al. (2011) em São Paulo/SP (LAM 36,1%, T 33,3% e H 15,3%), no realizado por Santos et al. (2013) em Araraquara/SP (LAM 58,3%, T 20,2% e H 14,3%) e no realizado por Pitondo-Silva (2013) em 4 diferentes cidades do Brasil (LAM 38,6%, T 29,5%, H 13,6%).

A família LAM predominante na América do Sul, corresponde com 45% dos dados presentes no SpolDB4. Embora a freqüência da família LAM seja alta na América Latina diferenças regionais são observados, variando entre 65% na Venezuela para 17,4% na Guiana Francesa (BRUDEY et al., 2006). A predominância da família LAM nesse estudo e no Brasil, também foi relatada em Portugal (51%) por David et al. (2007).

Entre os genótipos encontrados no estudo, o SIT 42 (LAM9) foi o mais freqüente com 15,2%. Vários estudos relataram que este SIT é bastante comum no Brasil (MALASPINA et al., 2008; NOGUTI et al, 2010; MENDES et al, 2011). Apresenta distribuição ubiqüitária sendo predominante na América do Sul (32,52%), seguido pela América do Norte (14,88%), Sul da Europa

(10,91%), Norte da África (9,34%) e Oeste Europeu (6,25%) (SITVITWEB, 2012).

Quanto à localização geográfica dos demais SITs encontrados, pode-se observar que o SIT435 (LAM9) é um tipo descrito apenas no Brasil e nos Estados Unidos. Os demais SIT 51 (T1), SIT 244 (T1), 52 (T2), SIT 20 (LAM1), SIT 17 (LAM2), SIT 125 (LAM3), SIT 1491 (LAM3), SIT 60 (LAM4), SIT 828 (LAM4), SIT 64 (LAM6), SIT 512 (H3), SIT 73 (U), SIT 825 (U) e 1321 (U), apresentam distribuição ubiqüitária e já foram encontrados no Brasil. No entanto o SIT 1302 (T2) nunca havia sido relatado no Brasil anteriormente, sendo encontrado na Itália, em Taiwan e em países africanos. A presença do SIT 1302 no estudo pode ser justificada pela presença de imigrantes destes países no Norte de Minas Gerais.

Dos 33 isolados clínicos analisados pela técnica de *Spoligotyping*, 30 isolados (90,9%) foram classificados de acordo com o banco de dados SITVIT2 e 03 (9,1%) não foram classificados. Destes, 17 foram agrupados em 6 *clusters* (51,5%) e 16 isolados apresentaram perfis únicos. Estes dados se assemelham aos do estudo realizado por Pitondo-Silva et al. (2013), que analisou 44 isolados, destes 25 (56,8%) formaram 8 *clusters* e 19 apresentaram perfis únicos.

A técnica do RD^{Rio} foi aplicada apenas aos espoligotipos da família LAM, para uma agrupagem desta família, quanto a presença ou ausência desta deleção, que está relacionada a virulência de cepas de *M. tuberculosis*. Em relação a mutação RD^{Rio}, 66,7% pertenciam a essa linhagem, e entre os isolados classificados como RD^{Rio}, 50% eram resistentes a INH. Dentro das subfamílias LAM, a presença da deleção RD^{Rio} foi mais expressiva na

subfamília LAM9 (33,3%). O estudo realizado por Santos et al. (2013), também detectou a linhagem RD^{Rio} entre seus isolados da família LAM (46,9%), e a presença dessa linhagem também foi mais expressiva na subfamília LAM9. A linhagem RD^{Rio}, foi primeiramente encontrada entre isolados em cluster provenientes da cidade do Rio de Janeiro (GIBSON et al., 2008; LAZZARINI et. al., 2007). Devido a alta prevalência de tuberculose causada pela linhagem RD^{Rio}, esta deleção pode estar relacionada com a potencialização da virulência e/ou a uma adaptação específica do patógeno em relação a população susceptível (DAVID et. al., 2012; LAZZARINI et. al., 2007).

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 têm 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 foi proposta como um novo padrão molecular para estudos epidemiológicos (HONISCH et al., 2010) e foi utilizada nos estudos de Mendes et al. (2011), Santos et al. (2013) e Pitondo-Silva et al. (2013).

Nesse estudo realizado com os 33 isolados do Norte de Minas Gerais, a técnica de *Spoligotyping* foi utilizada em associação com as técnicas de ERIC-PCR e de MIRU-VNTR.

A genotipagem pela técnica do ERIC-PCR promoveu a formação de 33 perfis distintos, indicando um elevado grau de polimorfismo entre os isolados. No entanto, 18 (54,5%) isolados foram agrupados em 09 grupos com mais de 96% de similaridade (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9) (Tabela 8). A técnica

do ERIC-PCR é composta por elementos repetitivos, de 126 pares de bases, distribuídos ao longo do cromossomo, que são estáveis no genoma do *M. tuberculosis*. Estes domínios são altamente polimórficos, possivelmente como resultado de eventos de recombinação entre as repetições (YUK-FONG et al., 1995; RIVERA et al., 1995; RODRIGUEZ-BARRADAS et al., 1995). Esta técnica foi comparada com outras técnicas e apresentou reprodutibilidade demonstrando ser mais discriminatória do que a técnica de RFLP (SECHI et al., 1998).

A genotipagem dos isolados clínicos, pela técnica de MIRU-VNTR, também não proporcionou a formação de grupos genéticos com 100% de similaridade. No entanto, 16 (48,5%) isolados foram agrupados em 08 grupos genéticos com similaridade superior a 90% (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 e M8) (Tabela 9). Estudos demonstram que, o MIRU-VNTR apresenta estabilidade temporal, designando este como sendo um método robusto, com elevado poder discriminatório para estudos epidemiológicos moleculares (SAVINE et al., 2002).

A genotipagem realizada nesse estudo, com técnica de MIRU-VNTR excluiu os agrupamentos formados pela técnica de *Spoligotyping*, demonstrando realmente, que a técnica de MIRU-VNTR, apresenta um maior poder discriminatório em relação ao *Spoligotyping*. Esse resultado corrobora com os estudos de Noguti et al. (2012) e Mendes et al. (2011), que demonstraram que alguns isolados agrupados pela técnica de *Spoligotyping* (100%), foram separados pela combinação das duas técnicas, constatando também o aumento do poder discriminatório proveniente da associação das duas metodologias.

Para Gori et al. (2005), há necessidade de implementar métodos epidemiológicos moleculares cada vez mais rápidos, para rastreamento e controle epidemiológico de disseminação da tuberculose, principalmente quando os resultados devem ser liberados rapidamente, tal como em surtos, ou na gestão de transmissão da tuberculose multirresistente, especialmente em situações de alto risco, como prisões, escolas e hospitais.

A associação das técnicas ERIC-PCR e MIRU-VNTR, na genotipagem dos 33 isolados clínicos promoveu a formação de 06 grupos polimórficos com mais de 90% de similaridade (EM1, EM2, EM3, EM4, EM5, EM6), envolvendo 12 (26,4%) isolados (Tabela 10).

Quando avaliamos isoladamente a técnica de ERIC e MIRU, verificamos que a técnica de ERIC promoveu a formação de 09 grupos genéticos com similaridade acima de 90%. Já a técnica de MIRU promoveu a formação de 08 grupos genéticos com similaridade acima de 90%. No entanto, averiguamos que o grupo genético formado pelos isolados MG033 e MG034 e o grupo formado pelos isolados MG035 e MG036 foram identificados por ambas as técnicas com mais de 90% de similaridade. Sugerindo assim, que as técnicas de ERIC e MIRU apresentam sensibilidade semelhante, na discriminação das diversidades genéticas. Entretanto, o estudo comparativo foi realizado com apenas 33 isolados clínicos, havendo a necessidade de ampliar o número da amostragem para sua validação.

A melhor maneira de diferenciar cepas de *M. tuberculosis* é usando marcadores independentes, para aumentar a precisão dos estudos epidemiológicos e a correlação entre a epidemiologia clássica e a epidemiologia molecular (SECHI et al., 1998)

A origem eventual da diversidade genética de *M. tuberculosis* no Brasil é devido a aspectos políticos, econômicos e sociais da sociedade, assim como uma consequência dos cinco séculos de relações interétnicas de pessoas em todo o mundo (PARRA et al., 2003).

Este tipo de estudo é importante para traçar relações entre os isolados de *M. tuberculosis*, podendo assim, ajudar a interromper a cadeia de transmissão da TB através da identificação dos perfis genéticos encontrados. A associação de ferramentas mais discriminatórias (ERIC-PCR / MIRU-VNTR), e um período mais longo de estudo é fundamental para uma melhor compreensão da TB na Região Norte de Minas Gerais.

6.0 CONCLUSÕES

- A partir da análise das amostras clínicas de 345 pacientes com suspeita de TB pulmonar, 33 (9,6%) apresentaram cultura positiva.
- Dos 33 pacientes que apresentaram cultura positiva, 25 (75,8%) apresentaram a baciloscopia positiva e 08 (24,2%) a baciloscopia negativa.
- Dos 33 isolados clínicos obtidos submetidos a identificação através da técnica de PCR//IS6110, 100% foram identificados como sendo *M. tuberculosis*.
- O HUCF atendeu de 18,2 a 20,7% dos casos de TB notificados no município no período estudado (2011 a 2012).
- A doença continua predominante em indivíduos do sexo masculino, de etnia parda, de baixa escolaridade, em idade economicamente ativa (20 a 59 anos).

- De acordo com aos dados epidemiológicos clínicos, verificamos o predomínio de casos novos, uma baixa taxa de cura e uma elevada taxa de transferência entre os pacientes avaliados. Os agravos mais evidentes continuam sendo, a co-infecção TB/HIV e o alcoolismo.
- A taxa de tratamento observado tem sido de 42,4%.
- A análise dos perfis genéticos obtidos com os dados presentes no SITIVIT2 permitiu, a identificação de 22 perfis genéticos distintos, com a formação de 3 famílias, 10 subfamílias e 19 SIT distintos. Dentre os perfis genéticos encontrados 15 (45,5%) pertencem a família LAM, 04 (18,2%) a família T, 01 (3,0%) a família H, 08 (24,2%) ao perfil U e 03 (9,1%) foram designados como perfis novos.
- Pela análise dos 22 perfis genéticos foi verificado que, os perfis pertencentes a família LAM estão presentes nos 8 municípios do Norte de Minas (Epinosa, Itacarambi, Montes Claros, Santa Bárbara, São Francisco, Janaúba, Novo Horizonte e Varzelândia). Esta ampla distribuição da família LAM, além de ser a mais freqüente no estudo, está presente em todo o Norte de Minas Gerais. Por outro lado os perfis pertencentes a família T e os perfis U estavam presentes somente no município de Montes Claros.
- A genotipagem através da técnica de *Spoligotyping*, demonstrou o predomínio da família LAM (subfamília LAM9/SIT 42), sendo 66,5% pertencentes a linhagem R^{Drio}.
- A genotipagem pela técnica do ERIC-PCR, dos 33 isolados clínicos, promoveu a formação de 33 perfis distintos, indicando um elevado grau de polimorfismo entre os isolados, não havendo formação de grupos genéticos

com 100% de similaridade. No entanto, 18 (54,5%) isolados foram agrupados em 09 grupos com mais de 96% de similaridade.

- A análise dos 33 isolados clínicos, pela técnica de MIRU-VNTR, indica que não houve formação de grupos genéticos com 100% de similaridade. No entanto, 16 (48,5%) isolados foram agrupados em 08 grupos genéticos com similaridade superior a 90%.
- Os isolados que foram agrupados pela técnica de *Spoligotyping* em 6 *cluster*, foram separados quando analisados isoladamente ou associados com a técnica de ERIC-PCR e MIRU. Demonstrando uma elevada diversidade genética, entre os isolados provenientes do Norte de Minas Gerais.
- A associação das técnicas ERIC-PCR e MIRU-VNTR na genotipagem dos 33 isolados clínicos promoveu a formação de 06 grupos polimórficos com mais de 90% de similaridade.
- Os resultados podem indicar que as técnicas de ERIC e MIRU apresentam sensibilidade, para discriminar a diversidade genética.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, C. C. D. **Genotipagem de Isolados de *Mycobacterium tuberculosis* do Paraguai, da Argentina e da Venezuela.** Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, 2010.

ALLIX-BE´GUEC, C.; FAUVILLE-DUFAUX, M.; SUPPLY, P. Three-year population- based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 4, p.1398–1406, 2008.

APPOLINÁRIO, F. **Dicionário de metodologia científica:** um guia para a produção do conhecimento científico. São Paulo: Atlas, 2004. 300p.

ASSIS, E. A. R.; FIRMINO, K. F. Tuberculose: perfil epidemiológico do município de Timóteo – MG, durante o ano de 2007. **Farmácia & Ciência.**, v.1, p.52-63, 2010.

AUGUSTO, C. J.; CARVALHO, W.S.; GONÇALVES, A.D.; CECCATO, M. G. B.; MIRANDA, S. S. Características da tuberculose no estado de Minas Gerais entre 2002 e 2009. **J. Bras. Pneumol.**, v.39, p. 357-364, 2013.

BACKER, M. A.; HARRIES, A. D.; JEON, C. Y.; HART, J. E.; KAPUN, A., LONNROTH, K.; OTTMANI, S. E.; GOONESEKERA, S. D.; MURRAY, M. B. The impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes: A systematic review. **BMC.**, 9:81, 2011.

BENNETT, D. E.; ONORATO, I. M.; ELLIS, B. A.; CRAWFORD, J. T.; SCHABLE, B.; BYERS, R.; KAMMERER, J. S.; BRADEN, C. R. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from epidemiologically linked case pairs. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 11, p.1224–1229, 2002.

BIERRENBACH, A. L.; GOMES, A. B. F.; NORONHA, E. F.; SOUSA, M. F. M. Incidência de Tuberculose e taxa de cura, Brasil, 2000 a 2004. **Rev. Saúde Pública.**, v. 41, p. 24-33, 2007.

BORGES, M.; CAFRUNE, P. I.; POSSULO, L. G, VALIM, A. R. M.; RIBEIRO, M. O.; ROSSETTI, M. L. R. Análise molecular de cepas *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de um centro de saúde ambulatorial em Porto Alegre (RS). **Jornal Bras Pneumol.**, v. 30, n. 4, p. 448-54, 2004.

BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, A. L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Rev. Saúde Pública.**,v. 33, n. 3, p. 281-286, 1999.

BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, M. M.; MADEIRA, S. G.; LIMA, C.; BOFFO, M.; MATTOS, I.; et al. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. **Microbes Infect.**, v. 7, p. 1338-1344, 2005.

BRASIL. Governo Federal (2011). **Índice de Desenvolvimento da Educação Básica (IDEB) - Resultados e Metas**. Página visitada em 15 de Agosto de 2012.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: **Boletim Epidemiológico / Especial Tuberculose**.v. 43, Março, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico-Tuberculose.**, v.44, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Série Histórica de Doenças de Notificação Compulsória por uf.1980-2005**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tuberculose_2006.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde :**Relatório de Situação : Minas Gerais /**

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 5. Ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Serviço de Vigilância em Saúde (SVS) – Ministério da Saúde 2010. [Acessado em março de 2012]. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa_incidencia_tb_1990_2010_atual_31_05_11.pdf.

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.

CATTAMANCHI, A.; HOPEWELL, P. C.; GONZALEZ, L. C.; OSMOND, D. H.; MASAE KAWAMURA, L.; DALEY, C. L.; JASMER, R. M. A 13-year molecular epidemiological analysis of tuberculosis in San Francisco. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v.10, n.3, p.297–304, 2006.

CLARK, C. M.; DRIVER, C. R.; MUNSIFF S. S.; DRISCOLL, J. R.; KREISWIRTH B. N.; ZHAO, B.; EBRAHIMZADEH, A.; SALFINGER, M.; PIATEK, A. S.; ABDELWAHAB, J. Universal genotyping in tuberculosis control program, New York City, 2001–2003. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 5, p.719–24, 2006.

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.

DAHLE, U. R.; ELDHOLM, V.; WINJE, B.A.; MANNSAKER, T.; HELDAL, E. Impact of immigration on the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in a low-incidence country. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.176, n.9, p.930–935. 2007.

DALE, J. W.; BRITAIN, D.; CATALDI, A. A.; COUSINS, D.; CRAWFORD, J. T.; DRISCOLL, J.; HEERSMA, H.; LILLEBAEK, T.; QUITUGUA, T.; RASTOGI, N.; SKUCE, R. A.; SOLA, C.; VAN SOOLINGEN, D.; VINCENT, V. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. **Int J Tuberc Lung Dis.**, v. 5, p. 216-219, 2001.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respir Med.**, v. 100, n.11, p. 1862-1870, 2006.

DANIEL, T. M. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.**, v. 4, n.5, p. 395-400, 2000.

DAVID, S.; DUARTE, E. L.; LEITE, C. Q. F.; RIBEIRO, J. N.; MAIO, J. N.; E. PAIXÃO, et al, Implication of the RD(Rio) *Mycobacterium tuberculosis* sublineage in multidrug resistant tuberculosis in Portugal, *Infect. Genet. Evol.* 12 (2012) 1362–1367.

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 population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. **Infect Genet Evol.**, v. 7, n. 5, p. 609-617, 2007.

DIETZE, R.; HADAD, D. J.; PEREIRA, F. E. L. Tuberculose. In: – ROCHA, MANOEL OTÁVIO DA COSTA E COL. Fundamentos em Infectologia. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2009. Cap. 38, p. 703-738.

DIRETRIZES PARA A TUBERCULOSE. 11º Consenso Brasileiro de Tuberculose. **J. Bras. Pneu.**, v. 30, n. 1, 2004.

EMBRAPA MONITORAMENTO POR SATÉLITE. **Minas Gerais**. Página visitada em 10 de Agosto de 2011.

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.

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.

Gil, A.C. **Métodos e Técnicas/ Antônio Carlos Gil**. 6ª edição. São Paulo: Atlas 2008, 200 Pág.

GOMES, H. M.; ELIAS, A. R.; OETEMAN, M. A. C.; PEREIRA, M. A.; MONTES, F. F. O.; MARSICO, A. G.; KRITSKI, A. L.; FILHO, L. A.; CALDAS, P. C.; POSSUELO, L. G.; CAFRUNE, P.; ROSSETTI, M. L.; LUCENA, N.; SAAD, M. H. F.; CAVALCANTI, H. R.; LEITE, C. Q. F.; BRITO, R. C.; LOPES, M. L.; LIMA, K.; SOUZA, M.; TRINDADE, R. C.; ZOZIO, T.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; SUFFYS, P. N. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis*

complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. **Infection, Genetics and Evolution.**, v.12, p. 649-656, 2012.

GUIMARÃES, G. M.; LOBO, A. P.; SIQUEIRA, E. A.; BORGES, T. F. F.; MELO, S. C. C. Tuberculose, HIV e pobreza: Tendência temporal no Brasil, Américas e mundo. **Jornal Bras Pneumol.**, v. 38, n. 4, p. 511-517, 2012.

MELO, FA. Tuberculose. In: VERONESI, R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. Capítulo 74, p.914-959.

FOXMAN, B.; RILEY L. Molecular Epidemiology: focus on infeccion. **Am. J. Epidemiol.**, v. 153, n. 12, p.1135-41, 2001.

GAGNEUX, S. et al. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis. **Plos Pathogens.**, v. 2, n. 6, p. 603-610, 2006.

GENG, E.; KREISWIRTH, B.; DRIVER, C.; LI, J.; BURZYNSKI, J.; DELLALATTA, P.; LAPAZ, A.; SCHLUGER, N.W.Changes in the transmission of tuberculosis in New York City from 1990 to 1999. **N. Engl. J. Med.** V.346, n.19, p.1453–1458, 2002.

GIBSON, A. L. et al. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio sublineage of the Latin american-mediterranean Mycobacterium tuberculosis spoligotype family. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 46, n. 4, p. 1259-1267, 2008.

GLYNN, J. R.; CRAMPIN, A.C.; TRAORE, H.; CHAGULUKA, S.; MWAFULIRWA, D. T.; ALGHAMDI, S.; NGWIRA, B.M.; YATES, M.D.; DROBNIIEWSKI, F. D.; FINE, P. E. Determinants of cluster size in large, population-based molecular epidemiology study of tuberculosis, northern Malawi. **Emerg. Infect. Dis.** V.14, n.7, p.1060–66, 2008.

GRANDE BRASIL. **Município de Montes Claros, estado de Minas Gerais (MG)**. Página visitada em 05 de Setembro de 2012.

ICA. Instituto de Ciências Agrárias (2011). **O ICA**. Página visitada em 20 de Setembro de 2012.

GONÇALVES, B. D. **Perfil Epidemiológico da exposição à tuberculose em um hospital universitário: uma proposta de monitoramento da doença** [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; 2009.

GORI, A.; BANDERA, A.; MARCHETTI, G.; DEGLI ESPOSTI, A.; CATOZZI, L.; et al. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. **Emerg Infect Dis.**, v. 11, p. 1242–1248, 2005.

GUTIERREZ, M. C.; BRISSE, S.; BROSCHE, R. et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS. Pathog.**, v. 1, n. 1, 2005.

INIGO, J.; ARCE, A.; PALENQUE, E.; DE VIEDMA, D.G.; CHAVES, F. Decreased tuberculosis incidence and declining clustered case rates, Madrid. **Emerg. Infect. Dis.** V.14, n.10, p.1641–43, 2008.

INIGO, J.; GARCÍA DE VIEDMA, D.; ARCE, A.; PALENQUE, E.; ALONSO RODRÍGUEZ, N.; RODRÍGUEZ, E.; RUIZ SERRANO, M. J.; ANDRE´S, S.; BOUZA, E.; CHAVES, F. Analysis of changes in recent tuberculosis transmission patterns after a sharp increase in immigration. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, n.1, p.63–69, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA [site da internet]. Brasília: **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** [visitado em abril 2012]. Censo 2010. <http://censo2010.ibge.gov.br/>

INTERNATIONAL SPOLIGOTYPE DATABASE SITVIT – **Institute Pasteur Guadeloupe**. [Acessado em Julho de 2009]. Disponível em: www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/

JESUS, B. F. G.; SOUZA, P. G.; SILVEIRA, M. F.; SANTI, L. R. E. Perfil epidemiológico de tuberculose na cidade de Montes Claros de 2005 a 2009. **Rev. Bras. Farm.**, v.93, n.1, p. 80-84, 2012.

JUNIOR, A. C. A. et al. **Atenção à Saúde do Adulto Tuberculoso. Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais.** 1ª ed. Belo Horizonte, 2006.

JUSBRASIL (2008). **Santa Casa de Montes Claros recebe recursos do Pro-Hosp.** Página visitada em 15 de Agosto de 2012.

KAMERBEEK J, SCHOOLS 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 users guide. **J. Appl. Microbiol.**, v.94, n.5, p.781-791. 2003.

KASPER, D. L. et al. **Harrison Medicina Interna.** 16 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006, v.1; 1565p.

KWIATKOWSKI, D. Genetic susceptibility to malaria getting complex. **Cur. Opin. in Genetics and Develop.**, v. 10, p. 320–324, 2000.

KESHAVJEE, S.; GELMANOVA, I. Y.; PASECHNIKOV, A. D.; MISHUSTIN, S. P.; ANDREEV, Y. G.; YEDILBAYEV, A.; FURIN, J. J.; MUKHERJEE, J. S.; RICH, M. L.; NARDELL, E. A.; FARMER, P. E.; KIM, J. Y.; SHIN, S. S. Treating multidrug-resistant tuberculosis in Tomsk, Russia: developing programs that address the linkage between poverty and disease. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 22, n.1136, p. 1–11, 2008.

KILK, S.V.; VERVER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P.E.; COBELENS, F.G.; KREMER, K.; VAN DEUTEKOM, H.; BORGDORFF, M.W. Tuberculosis outbreaks predicted by characteristics of first patients in a DNA fingerprint cluster. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.178, n.1, p.96–104, 2008.

KUDOH, S.; KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. **Bull. World.Org., Santé**, v. 51, p. 71-82, 1974.

KUNIMOTO, D.; SUTHERLAND, K.; WOOLDRAGE, K.; FANNING, A.; CHUI, L.; MANFREDA, J.; LONG, R. Transmission characteristics of tuberculosis in the foreign-born and the Canadian-born populations of Alberta, Canada. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v.8, n.10, p.1213–20, 2004.

LAMBREGTS-VAN WEEZENBEEK, C. S.; SEBEK, M. M.; VAN GERVEN, P. J.; DE VRIES, G.; VERVER, S.; KALISVAART, N. A.; VAN SOOLINGEN, D. Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. **J. Tuberc. Lung Dis.**, v.7, n.12, p.463–470, 2003.

LAZZARINI, L. C.; HUARD, R. C.; BOECHAT, N. L.; GOMES, H. M.; OELEMANN, M. C.; KUREPINA, N.; et al. Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.** 45 (2007) 3891–3902.

LEITE, M. E.; PEREIRA, A. M. (2005). **Expansão territorial e os espaços de pobreza na cidade de Montes Claros**. Observatório Geográfico América Latina. Página visitada em 10 de Setembro de 2012.

LEVIN, B.R.; LIPSITCH, M.; BONHOEFFER, S. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. **Science.**, v.283, n.5403, p.806-9, 1999.

LILLEBAEK, T.; ANDERSEN, A. B.; BAUER, J.; DIRKSEN, A.; GLISMANN, S.; DE HAAS, P.; KOK-JENSEN, A. Risk of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in a low-incidence country due to immigration from high-incidence areas. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n.3, p.855–61, 2001.

YUK-FONG, L. P.; LAU, Y. J.; B. S. HU, J. M. SHYR, Z. Y. SHI, W. S. TSAI, Y. H. LIN, TSENG C. Y. Analysis of clonal relationship among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1779–1783, 1995.

MACIEL, E. L. N. *etal.* Associação entre coleta de escarro guiada e taxa de contaminação de culturas para o diagnóstico de TB pulmonar. **J. Bras. de Pneumologia.**, v. 35, n.5, 2009.

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

MALASPINA, A. C.; CAVALCANTI, H. R.; LEITE, C. Q. F.; 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. **J. Infect. Dis.**, v. 61, p. 231-233, 2008.

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.

MARCONI, M. D. A.; LAKATOS, E. M. **Técnicas de pesquisa: planejamento e execução de pesquisa, amostragens e técnicas de pesquisa, elaboração, análise e interpretação de dados.** Atlas Editora. 4ª Edição. São Paulo, 1999.

MASCARENHAS, M. D. M.; ARAÚJO, L. M.; GOMES, K. R. O. Perfil epidemiológico da Tuberculose entre casos notificados no município de Piripiri, Estado do Piauí, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde.**, v. 14, n. 1, p. 7-14, 2005.

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. 04, p. 1901-1906, 2001.

MEDEIROS, C. J.; PRETTI, C. B. O.; NICOLE, A. G. Características demográficas e clínicas dos casos de tuberculose notificados pelo núcleo de epidemiologia hospitalar no município de Vitória, estado do Espírito Santo, Brasil, 2009-2010. **Epidemiol Serv Saúde.**; v. 21, p. 159-166, 2012.

MENDES, J. M.; FONSECA, L. S.; LOURENCO, M. C.; FERREIRA, R. M. C.; SAAD, M. H. F. Um estudo retrospectivo dos aspectos epidemiológicos da tuberculose na comunidade do Complexo de Manguinhos localizado em área urbana do Rio de Janeiro, Brasil, 2000-2002. **J Bras Pneumol.**; v. 33, p. 443-447, 2007.

MENDES, N. H.; MELO, F. A.; SANTOS, A. C.; PANDOLFI, J. R.; ALMEIDA, E. A.; CARDOSO, R. F.; et al. Characterization of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in São Paulo city, Brazil. **BMC. Res. Notes.**, v. 29, n. 4, p. 269, 2011.

MENEZES, A. M. B.; COSTA, J. D.; GONÇALVES, H.; MORRIS, S.; LEMOS, M. M. S.; OLIVEIRA, R. K.; PALMA, E. Incidência e fatores de risco para tuberculose em Pelotas, uma cidade do Sul do Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.1, n. 1,1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Endêmicas. Área Técnica de Pneumologia Sanitária. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose.** Available from: www.opas.org.br/prevencao/site/UploadArq/ProgramaTB.pdf.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tratamento diretamente observado (TDO) da tuberculose na atenção básica:** protocolo de enfermagem. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

MIRANDA, S. S.; CARVALHO, S. W.; SULFYS, P. N.; KRILSKI, A. L.; OLIVEIRA, M.; ZARATE, N.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N.; GICQUEL, B. Spoligotyping of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the state of

Minas Gerais, Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 106, n. 3, p. 267-273, 2011.

MIYATA, M.; SANTOS, A. C. B.; MENDES, N. H.; CUNHA, E. A.; MELO, F. A. F.; LEITE, C. Q. F. Assessment of the quality of DNA extracted by two techniques from *Mycobacterium tuberculosis* for fast molecular identification and genotyping. **Brazilian Journal of Microbiology.**, v. 42, p. 774-777, 2011.

MOLHUIZEN, H. O.; BUNSCHOTEN, A. E.; SCHOULS, L. M.; VAN EMBDEN, J. D. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by spoligotyping. **Methods Mol Biol.** v.101 p. 381-394, 1998.

MUNIZ, J. N.; RUFFINO-NETTO, A.; VILLA, T. C.; YAMAMURA, M.; ARCENCIO, R.; CARDOZO-GONZALES, R. I. Epidemiological aspects of human immunodeficiency virus/tuberculosis co-infection in Ribeirão Preto, Brazil from 1998 to 2003. **J Bras Pneumol.**, v. 32, n. 529-34, 2006.

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

NOGUTI, E. N.; LEITE, C. Q.; MALASPINA, A. C.; SANTOS, A. C.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H.; et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Paraná in Southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** V. 105, p. 779–785, 2012.

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.

PAIVA, V. S.; PEREIRA, M.; MOREIRA, J. S. Perfil epidemiológico da tuberculose pulmonar em unidade sanitária de referência em Porto Alegre, RS. **Revista da AMRIGS.**, v.55, n. 2, p. 113-117, 2011.

PAIXÃO, L. M. M.; GONTIJO, E. D. Perfil de casos de Tuberculose notificados e fatores associados ao abandono, Belo Horizonte-MG. **Revista de Saúde Pública.**, v. 41, n. 2, p. 205-213, 2007.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents. Chem.**, v. 46, p. 2720-2722, 2002.

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. BásicaApl.**, v.28, n.3, p.251-257, 2007.

PARRA, F. C.; AMADO, R. C.; LAMBERTUCCI, J. R.; et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 100, p. 177–182, 2003.

PAZ, L. N. F.; OHNISHI, M. D. O.; BARBAGELATA, C. M.; BASTOS, F. A.; OLIVEIRA, J. A. F.; PARENTE, I. C. Efetividade do tratamento da tuberculose. **J Bras Pneumol.**, v. 38, p. 503-510, 2012.

PITONDO-SILVA, A; SANTOS, A. C. B.; JOLLEY, K. A.; LEITE, C. Q. F.; DIRINI, A. L. C. Comparison of three molecular typing methods to assess genetic diversity for *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods.**, v. 93, p. 42-48, 2013.

PRADO, T. N.; CAUS, A. L.; MARQUES, M.; MACIEL, E. L.; GOLUB, J. E.; MIRANDA, A. E. Epidemiological profile of adult patients with tuberculosis and AIDS in the state of Espírito Santo, Brazil: cross-referencing tuberculosis and AIDS databases. **J Bras Pneumol.**, v. 37, n. 1, p. 93-9, 2011.

QUADROS-COELHO, M. A.; BISCOTTO, C. R.; TINOIS, B. R.; FREITAS, F. C.; OLIVEIRA, J. S.; AZEVEDO, M. F.; JÚNIOR, H. M. Prevalência da infecção

tuberculosa em universitários da Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais. **Rev. Bras. Edu. Med.** v. 33, n. 4, p.535-541, 2009.

RIVERA, I. G. CHOWDHURY, M. A.; HUQ, R. A.; JACOBS, D.; MARTINS, M. T.; COLWELL, R. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2898–2904, 1995.

RODRIGUEZ-BARRADAS, M. C.; HAMILL, R. J.; HOUSTON, E. D.; GEORGHIOU, P. R.; CLARRIDGE, J. E.; REGNERY, R. L.; KOHELER, J. E. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p.1089–1093, 1995.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n.1, p.51-58, 2002.

SAN PEDRO, A.; OLIVEIRA, R. M. Tuberculose e Indicadores socioeconômicos: Revisão Sistemática da literatura. **Rev. Panam. Salud. Publica.**, v.33, n. 4, p. 294-301, 2013.

SANTOS, A. B. C.; GASPARETO, R. M.; VIANA, B. H. J.; MENDES, N. H.; PANDOLFI, J. R. C.; CARDOSO, R. F.; SATO, D. N.; DAVID, S. C. M.; SAAD, M. H.; RASTOGI, N.; LEITE, C. Q. F. *Mycobacterium tuberculosis* population structure shift in a 5-year molecular epidemiology surveillance follow-up study in a low endemic agro-industrial setting in São Paulo, Brazil. **International Journal of Mycobacteriology.**, v.2, p. 156-165, 2013.

SAVINE, E.; WARREN, R. M.; VAN DER SPUY, G. D.; BEYERS, N.; VAN HELDEN, P. D.; LOCHT, C. et al. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 4561-4566, 2002.

SECHI, L. A.; ZANETTI, S.; DUPRÉ, I.; DELOGU, G.; FADDA, G. Enterobacterial repetitive intergenic consensus as molecular targets for typing

of *Mycobacterium tuberculosis* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n.10, p.3563-71, 2001.

SILVEIRA, M. P. T.; ADORNO, R. F. R.; FONTANA, T. Perfil dos pacientes com tuberculose e avaliação do programa nacional de controle da tuberculose em Bagé (RS). **J Bras Pneumol.**; v. 33, n. 2, p. 199-205, 2007.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN)
[Acessado em março de 2013. Disponível em:
<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>

SOUZA, M.; GILVAN R. **Tuberculose: do ambulatório à enfermaria** / Gilvan R. Muzy de Souza, Afrânio L. Kritski, Marcus B. Conde. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minissatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molec. Microbiol.**, v.36, n. 3, p. 762-71, 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.; ALLIX, C.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RÜSCHGERDES, S.; WILLERY, E.; SAVINE, E.; DE HAAS, P.; VAN DEUTEKOM, H.; RORING, S.; BIFANI, P.; KUREPINA, N.; KREISWIRTH, B.; SOLA, C.; RASTOGIN.; VATIN, V.; GUTIERREZ, M.C.; FAUVILLE, M.; NIEMANN, S.; SKUCE, R.; KREMER, K.; LOCHT, C.; VAN SOOLINGEN, D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, n.12, p.4498-4510, 2006.

UFMS. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (2005). **Montes Claros (MG)**. Página visitada em 10 de Agosto de 2012.

VAN DEUTEKOM, H.; SUPPLY, P.; DE HAAS, P.E.; WILLERY, E.; HOIJNG, S.P.; LOCHT, C.; COUTINHO, R.A.; VAN SOOLINGEN, D. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n. 9, p.4473–79, 2005.

van EMBDEN, J. D. A.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J. T.; 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, p. 406-409, 1993.

VENDRAMINI, S. H.; VILLA, T.C.; SANTOS, M. D. E. L.; GAZETTA, C. E. Current epidemiological aspects of tuberculosis and the impact of the DOTS strategy in disease control. **Rev Lat Am Enfermagem.**; v. 15, n. 1, p. 171-3. 2007.

VIEIRA, S.; HOSSNE, W. S. **Metodologia científica para a área de saúde**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.192p.

VON GROLL, A.; MARTIN, A.; PORTAELS, F.; SILVA, P.E.A.; PALOMINO, J.C. Growth kinetics of *Mycobacterium tuberculosis* measured by quantitative resazurin reduction assay: a tool for fitness studies. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, p. 300-303, 2010.

XAVIER, M. I. M.; BARRETO, M. L. Tuberculose na cidade de Salvador, Bahia, Brasil: o perfil na década de 1990. **Cadernos de Saúde Pública.**, v. 23, n. 2, p. 445-453, 2007.

WEIS, S. E.; POGODA, J. M.; YANG, Z.; CAVE, M. D.; WALLACE, C.; KELLEY, M.; BARNES, P. F. Transmission dynamics of tuberculosis in Tarrant county, Texas. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.166, n.1, p.36–42, 2002.

YUN, K. W.; SONG, E. J.; CHOI, G. E.; HWANG, I. K.; LEE, E. Y.; CHANG, C. L. Strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea by

mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats. **Korean J Lab Med.**, v.29, n. 4, p.314-9, 2009.

ZHANG, Y.; YEW, W. W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis**, v.13, n.11, p.1320–1330, 2009.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v.358, p.591–593, 1992.

8.0 ANEXOS

8.1 Parecer Consubstanciado



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO

Montes Claros, 03 de março de 2010.

Processo N. ° 1881

Título do Projeto: **INCIDÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM PACIENTES RESIDENTES NA REGIÃO NORTE DE MINAS GERAIS.**

Orientanda: **Karina Andrade de Prince**

Orientadora: **Clarice Queico Fujimura Leite.**

Relatora: **Profa. Vânia Silva Vilas Boas Vieira Lopes.**

Histórico

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 conseguidas através de métodos laboratoriais convencionais. A tuberculose (TB) é principalmente um sintoma da pobreza e da desigualdade, que representa a sua prevalência ininterrupta em muitas partes do mundo. Esta disparidade da carga de TB é agravada pela emergência generalizada de cepas resistentes aos antibióticos. Ela continua a ser uma preocupação de saúde em todo o mundo e tem sido caracterizada como uma epidemia pelo Mundo segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), onde se estima que um terço da população do mundo tenha sido infectada com o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) sendo que 3 milhões de pessoas morrem da doença e 10 milhões são infectadas anualmente. A distribuição da tuberculose em diferentes regiões geográficas é caracterizada pela prevalência de diferentes cepas de MTB, com virulência e resistência aos medicamentos. Fatores ambientais e do hospedeiro são responsáveis pela transmissão e prevalência de diferentes cepas de MTB. Atualmente, em várias regiões do mundo, considera-se que são responsáveis pela elevação alarmante da incidência da TB, a infecção pelo HIV, o uso de drogas injetáveis, o aumento da pobreza, do número de desabrigados, a imigração, a má nutrição, a urbanização e a perda da qualidade dos programas de controle da tuberculose. A epidemiologia molecular utiliza concomitantemente técnicas de

biologia molecular, que caracterizam o conteúdo nucleotídico e a epidemiologia clássica, que estuda a distribuição e os fatores determinantes da doença nas populações humanas. 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 conseguidas através de métodos laboratoriais convencionais..

Mérito

O presente estudo tem como objetivo identificar por PCR as cepas de *M. tuberculosis* e genotipar através das técnicas de MIRU e de Spoligotyping os isolados clínicos, provenientes de pacientes residentes na região norte de Minas Gerais no período de 2010 a 2014. Serão analisados aproximadamente 500 isolados de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes atendidos no Hospital Universitário Clemente de Faria/Unimontes de Montes Claros. O projeto não apresenta risco, desconforto mínimo e nenhum procedimento invasivo, não havendo nenhum tipo de dano aos sujeitos.

Parecer

A presidência do Comitê de Ética da Unimontes analisou o processo 1881, e entende que o mesmo está completo e dentro das normas do Comitê e das Resoluções do Conselho Nacional da Saúde/Ministério da Saúde. Sendo assim, somos pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa.



Profª. Vânia Silva Vilas Boas Vieira Lopes

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Unimontes

8.2 Ficha de Notificação / Investigação Tuberculose

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO		Nº
FICHA DE NOTIFICAÇÃO / INVESTIGAÇÃO TUBERCULOSE				
<p>TUBERCULOSE PULMONAR: Paciente com tosse com expectoração por três ou mais semanas, febre, perda de peso e apetite, com confirmação bacteriológica por baciloscopia direta e/ou cultura e/ou com imagem radiológica sugestiva de tuberculose. TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR: Paciente com evidências clínicas, achados laboratoriais, inclusive histopatológicos, compatíveis com tuberculose extrapulmonar ativa, ou pacientes com pelo menos uma cultura positiva para <i>M. tuberculosis</i> de material proveniente de localização extrapulmonar.</p>				
Dados Gerais	1	2 - Individual		
	2	Agravado/doença		3
	4	5	6	7
	6	7		
Notificação Individual	8			9
	10	11	12	13
	14			
	15		16	
	17	18	19	
Dados de Residência	20		21	
	22	23		24
	25		26	
	27		28	
	29		30	
	31			
	32			
Antecedentes Epidemiológicos	33		34	
	35			
Dados Clínicos	36		37	
	38		39	
	40			
Dados de Laboratório	41		42	
	43		44	
Tratamento	45		46	
	47		48	
Investigador	49		50	
	51		52	

CAPÍTULO II

Publicações relacionados a Tese de Doutorado

Título	Autores	Revista	Status - Ano
Epidemiology and Control of Tuberculosis in Montes Claros-MG, Brazil, between 2002, and 2011.	Prince, KA Dantas, IKC Carvalho, ACB Dias, ERO Sisílio, SHC Leite, CQF	Journal of Human Kinetics Fator de Impacto 0,5	Aceito 2013
Epidemiological study of socio-demographic and clinical aspects of tuberculosis in montes claros-mg, brazil, 2002-2011	Prince, KA Dantas,IKC Carvalho, ACB Dias, ERO Bicalho, JN Sisilio, SHC Ruas, AC Prince, PMA Leite, CQF	Revista Argentina de Microbiologia Fator de Impacto - 0,5	Publicação de Resumo Expandido 2013
Phylogenetic analysis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains in North of Minas Gerais, using the techniques of ERIC-PCR and MIRU-VNTR, associated with spoligotyping	Prince, KA Santos, ACB David, S Sato, DN Leite, CQF	Journal of Microbiological Methods Fator de Impacto - 2.56	Em fase final de redação – passando por um revisor de inglês

Artigos Publicados durante o Doutorado

Título	Autores	Revista	Status - Ano
Screening of molecules with anti-TB activity from the brazilian cerrado plants	Prince, KA Pavan, FR Sato, DN Villegas, W Leite, SRA Leite, CQF	Revista Portuguesa de Pneumologia Fator de Impacto 0,56	Publicado 2010
Occurrence of pathogenic environmental mycobacteria on surfaces in health institutions	Souza, MGM Sato, DN Leite, CQF Leite, SRA Sartori, FG Prince, KA Casmeiro, LA Martins, CHG	Research and Reports in Tropical Medicine Fator de Impacto - 0,5	Publicado 2010
Anti-Mycobacterium tuberculosis activity of fungus phomopsis stipata	Prince, KA Sordi, R Pavan, FR Araujo, AR Leite, SRA Leite, CQF	Brazilian Journal of Microbiology Fator de Impacto – 0,9	Publicado 2012
Isolation and Identification of Enviromental Mycobacteria in the water of a hemodialysis center	Sartori, FG Leandro, LF Montanari, LB Souza, MGM Pires, RH Sato, DN Leite, CQF Prince, KA Martins, CHG	Current Microbiology Fator impacto – 1,82	Publicado 2013
Epidemiological Profile Of Hepatitis B In Montes Claros-MG, Brazil, Between 2003 And 2012	Santos, FS Ferreira, AM Leão, FP Araujo, RN, Rezende, FR Souza, PHR Prince, KA	Journal of Human Kinetics Fator de Impacto 0,5	Aceito 2013

Epidemiology and control of tuberculosis in Montes Claros-MG, Brazil, between 2002 and 2011

Karina Andrade de Prince¹, Ivan Kleber Cardoso Dantas², Ana Cecília Brandão de Carvalho², Eyder Renalde Oliveira Dias², Sandro Hebert de Carvalho Sisílio², Clarice Queico Fujimura Leite³

The purpose of this study was to analyze the epidemiology and control of tuberculosis in Montes Claros-MG, Brazil, between years 2002 and 2011. The approach was epidemiological, descriptive, retrospective and quantitative. The data are from 1603 tuberculosis compulsory notifications recorded in the National System for Notifiable Diseases. Variables evaluated: incidence, prevalence, gender, age, ethnicity, level of schooling, manner of presentation of the disease, comorbidities and foreclosure situation treatment. To calculate incidence, prevalence and mortality, the data used were from the Brazilian Institute of Geography and Statistics along with the number of cases reported. The incidence rate was 39.10/100,000 and prevalence 44,77/100,000 inhabitants. Regarding the form of tuberculosis, the pulmonary tuberculosis had the highest number of notifications (65.3%), extrapulmonary had 29.82% and mixed corresponded 5.05% of the cases. Males predominated (62.57%), the age group with the highest number of notifications was of 35-49 years (28.57%). The mixed race prevailed over the others with 43.48% of the patients reported. Regarding schooling, 37.81% of patients had lower education. The proportion of ray-x chest suspect, smear and healing in our study was 80.9%, 45.09% and 53.03% respectively. The dropout rate of treatment was 4.74% and 3.6% died. Regarding comorbidities, 4.8% were co-infected with HIV and 8.4% alcoholics. Hence, through the analyzes, it is expressed the importance of preventing infection and the spread of information about the importance of proper treatment, in order to minimize the dropout rate and elevate the cure rate.

Key words: Descriptive epidemiology; Tuberculosis; Information Systems.

¹ Mestre em Análises Clínicas e doutoranda em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/ Araraquara (SP) e docente das Faculdades Integradas Pitágoras de Montes Claros (MG), Brasil.

² Acadêmicos do Curso de Graduação em Medicina das Faculdades Integradas Pitágoras de Montes Claros (MG), Brasil.

³ Professora Titular do Departamento de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/ Araraquara (SP), Brasil.

¹**Corresponding author:** Áustria Street, number 61, house 03, CEP: 39401-300, Montes Claros - MG, Brazil

Phone number: +55 (38) 91557743 / **E-mail:** Karina.prince@bol.com.br

Introduction

Tuberculosis (TB), whose prevalence is uninterrupted in many parts of the world is sustained by poverty and social inequality (Farmer et al., 2006). This disparity of TB burden that comes affecting developing countries is exacerbated by the emergence of strains resistant to antibiotics, making it a leading cause of death in the world (WHO, 2006).

It is a chronic infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* aerobic. This is preferred by lung parenchyma (pulmonary TB), although up to one third of cases there is involvement of other organs (extrapulmonary TB), and in some cases may occur disseminated form (pulmonary TB + extrapulmonary TB) (Pandolfi et al., 2006).

It is estimated that one third of the world population is infected by *M. tuberculosis*. However, only a small percentage of infected individuals develop disease. Thus, TB is classified as a global emergency by the World Health Organization (WHO), is considered a compulsorily notifiable disease that requires mandatory investigation (WHO, 2006).

According to recent data from WHO (2011), about 6.2 million cases were reported worldwide in 2010, with 82% of cases were concentrated in 22 countries, and contributes to 1.1 million deaths from HIV negative individuals and 350 million deaths in people co-infected (TB / HIV).

WHO has also detected an intense increase in the frequency of strains of *M. tuberculosis* Multiple drug resistant (MDR), that is around 500 thousand, represents a threat that should be carefully evaluated because the extension phase transmission enables these MDR strains become prevalent in many parts of the world (WHO, 2011).

The Ministry of Health has encouraged the control of TB, using the targets recommended by WHO to diagnose at least 70% of the expected cases; properly treat 100% of diagnosed cases; cure at least 85% of them, and keep the abandonment treatment with acceptable percentage (up 5%) (WHO, 2011).

Given the current context and the favorable conditions that the municipality provides, this study aimed to know the landscape of TB in Montes Claros (MG), aiding future actions that allow the control of the disease, and consequently its eradication in order to achieve the goals proposed by the WHO. The objective of this study was to analyze the epidemiology and control of TB in Montes Claros, MG, Brazil, between 2002 and 2011, through the compulsory notification of TB in the city registered the National System for Notifiable Diseases (SINAN).

Material and Methods

We conducted a study investigating was a descriptive, retrospective and quantitative design. The sample consisted of all notifications of TB occurred in Montes Claros (MG) from January 2002 to December 2011. Data were obtained from the database of SINAN provided by sector Epidemiology of Municipal Health municipality. The variables studied were the sociodemographic characteristics (gender, age, ethnicity and education) and clinical (chest x-ray, sputum, form of the disease, input type, comorbidities, and foreclosure situation). The data were grouped and structured into a database using the programs, Microsoft Office Excel 2007, Statistical Pockage for the Social Sciences (SPSS) for Windows, version 15.0 and Origin 7.1, thus tracing the incidence, prevalence and epidemiological characteristics of this disease. For the calculations of incidence, prevalence and mortality, we used data from the IBGE population along with the number of cases reported by SINAN. Regarding the ethical aspects, the present study was approved by the Ethics Committee of the State University of Montes Claros (UNIMONTES), case number1881.

Results

According to the data analyzed, 1603 were reported TB cases in the county. Thus, the disease incidence ranged from 29.77 to 54.14 cases per 100 000 inhabitants (mean 39.10), since the prevalence ranged from 39.09 to 59.50 cases per 100 000 inhabitants (mean 44.77). The peak incidence was in 2004 and the peak prevalence occurred in 2005 and after these periods there was a reduction in the number of cases and consequently the incidence and prevalence (Figure 1).

Regarding the analysis of epidemiological data sociodemographic the 1603 TB patients, 62.57% were male and 37.43% female. Ages ranged from 0 to > 80 years of age, with a prevalence of 28.57% aged 35-49 years, followed by 23.64% aged 20-34 years and 20.34% aged 50 to 64. The mulattoes prevailed over the others with 43.48% of the patients reported, followed by Caucasians with 29.69%. Regarding level of schooling, we can see that 37.81% of patients had lower education, where 31.13% of them reported having incomplete primary education and 6.68% were illiterate (Table 1).

Analyzing epidemiological data of 1603 patients with clinical TB, it was found that 80.97% obtained the x-ray chest suspect. Regarding the results of the laboratory examination of bacilloscopy, 45.04% were smear-positive and smear-negative 24.02%, however, 30.94% did not perform the test. With reference to the form of involvement of TB, it was found that the pulmonary form was the most frequently reported with 65.13% followed by 29.82% with extrapulmonary form and mixed form has been reported in 5.05% of cases. Regarding the input type, 84.65% were new cases, 6.3% were transfer, 5.05% were returns after default, 3.18% were relapse. As the foreclosure

situation of the disease we can see that 53.03% of the cases were cured, 34.87% of the cases were transferred for treatment in other municipalities, 4.7% abandoned treatment, 3.6% died in due to other causes, 0.81% died by disease and 0.06% were resistant to treatment (Table 2).

With regard to comorbidities, 4.8% of the patients were co-infected with HIV and 8.42% were alcoholics. However, 43.79% of the data in relation to HIV co-infection were ignored, thus hindering the realization of a more precise analysis concerning this relation (Table 3).

Discussion

Among the 22 countries with the largest outbreak of the disease in the world, Brazil in 1997 occupied the 10th place, already in 1998 moved to the 13th place in 2004 to 15th place, and the 2006 16th place and today Brazil is the 17th place in the ranking, portraying an improved overview of the disease (WHO, 2006; WHO, 2011; Assisi and Firmino, 2010; MS, 2006).

Data from the Ministry of Health (2012) disclose for the first time that TB cases in Brazil were lower than 70 thousand. The number of cases reported in the last year fell 3.54%, were 71,790 in 2010 against 69,245 in 2011. In the last decade, Brazil fell by 15.9% in the incidence rate of TB. In 2011, there were 36 cases of the disease for every 100,000 inhabitants, compared to 42.8 cases in 2001. With respect to deaths, the reduction was even greater, the death rate fell 23.4% in a decade. The country recorded 3.1 deaths for every 100 inhabitants in 2001, rising to 2.4 in 2010 (MS, 2012).

In the state of Minas Gerais disease incidence also declined over the years about 42%, in 2011 there were 20 cases of the disease per 100 thousand inhabitants, against 34.6 cases in 2001. Which puts Minas Gerais in 24th place in ratings among Brazilian states, including already reaching the index recommended as the millennium development goal, an incidence of 25.6 cases per 100,000 inhabitants by 2015 (MS, 2010).

In the state capital (Belo Horizonte), were recorded 30 cases of the disease, compared to 54.3 cases registered in 2001, and the reduction rate of 44.7% (Hino et al., 2011). Already in Montes Claros in 2011 were recorded 29.7 cases of illness for every 100,000 inhabitants against 54.1 cases registered in 2004, thus showing a reduction of 45% in the rate of disease.

Thus, we see that along with the reduction rate of the disease in Brazil, as reduction of the disease in the state of Minas Gerais, the state capital and consequently a greater reduction in Montes Claros. The decrease in the incidence of

TB throughout the Brazilian territory due to the implementation of public health policies, implemented from 2003, which prioritized the reduction of cases of the disease.

Regarding gender, our work is consistent with the literature in which demonstrates the prevalence of TB in males (Augusto et al., 2013).

The age at which there was a higher frequency of TB cases was 20 to 49 years (52.2%), data corroborate those of other studies (Piller, 2012). So, the disease has affected people in economically productive phase, which can cause an economic imbalance within families by requiring the removal of the patient from his work, even for a certain period, so that he, helped by medication, stop be bacillus (MS, 2010 b).

Most cases reported in the city of Montes Claros struck individuals belonging to the mulattoes, followed by the white race, which is consistent with the study by Medeiros et al. (2012).

Patients affected by TB, mostly have low education level (Passion and Gontijo, 2007). This finding corroborates data obtained in our study because most patients had not completed elementary school. The low level of education and access to information about the chain of TB transmission could justify the delay in the search for patient care (Silveira, Adorno and Fontana, 2007).

Compared to chest X-ray, although the majority of the population of the present study pulmonary form, only one third of the quota was submitted to the radiological study of thoracic structures (Mascarenhas, Araujo and Gomes, 2005).

The bacilloscopy was performed on 69% of the population, being positive in 45% of patients reported, determining that the positivity rate is below that recommended by the health ministry, which is 70%. Considering this is a fast, cheap and with the advantage of being able to run on low-resource, is widely used in laboratories, however, has a low sensitivity and specificity (MS, 2010 b).

Regarding the form of TB was found in this study that the pulmonary form was the most commonly reported (65.13%), followed by 29.82% with extrapulmonary form and mixed with 5.05% of cases. These data are presented in line with the values reported by another study, which posits that the pulmonary form is the most prevalent, with rates exceeding 50%, while the mixed form represents 3% of the total cases (Muniz et al. 2006). This feature may be related to the metabolic profile of the bacteria, which characterizes it as strictly aerobic, because it requires high concentrations of oxygen to survive (MS, 2010 b).

Through this study, as well as the de Medeiros, Pretti and Nicole (2012), we observed the prevalence of new cases among the total reported cases. For an effective reduction of new cases, it is necessary to develop a process to identify areas with different needs and actions, in which the TB control program will invest in finding

patients with respiratory symptoms, and identifying populations at risk for latent TB. To identify, and correctly handle these cases there will be a real reduction in the number of new cases (Augusto et al., 2013).

Studies show that the rate of co-infection with HIV may reach 30% of TB cases (Muniz et al., 2006). However, this study reveals a discrepancy in relation to the data obtained in our study, where 4.8% of patients are co-infected with HIV. This difference may be due to the large number of ignored / white, which represented 43.79% of total TB cases notified. However, in a study conducted in Belém (state of Pará), we note that the data agree with the values found in our research, with the 5.75% rate of co-infection with HIV (Paz et al., 2012).

Concerning alcoholism, studies show that the percentage of alcoholic patients with TB is represented by 25% (Passion and Gontijo, 2007). However, these data differ from the value obtained in our study, where only 8.42% of TB patients were alcoholics. However 18.28% of the data were presented as unknown / white, thus hindering the realization of a more precise analysis.

The number of deaths from the disease in Montes Claros showed an increase in 2007, a decrease in 2008 and a new high in 2009. Thereafter, there was decline in 2010, reaching no notification in 2011. However, in another study, we found a death rate of 4 and 7 % in the locations studied, higher than the rate found in our study (Paz et al., 2012). Studies show that in Brazil from 1999 to 2006 there was a 31% reduction in mortality rate per 100,000 inhabitants , and the United States the rate of TB mortality declined from 2.2 in 1990 to 0.47 per year 100.00 in 2006 (Conde et al., 2009; Jung, Jung and Sorvilho, 2010) .

Regarding the transfer endpoints, there was obtained a percentage of 34.87% between notifications analyzed, that is, higher than that found in the literature (8.1%). The high percentage of transfer favors the increase in the number of withdrawal and reduces the amount of cured patients, making it difficult to control the disease (MS, 2010 b).

The cure rate in our study was 53.03 %, which is consistent with that presented by another study , which refers to 68.8 % cure rate in 2000 and 54.9 % in 2004 , among the patients evaluated (Bierrenbach et al., 2007).

In relation to individuals who abandoned treatment, studies in the country demonstrate dropout rates around 7.9 and 10.4%. This is higher than the percentage found demonstrated in our study (5.7 %). Since , alcoholism, co -infection of TB / HIV , poor education and the fact that patients were not living with their families , are factors contributing to the abandonment of multidrug TB (Campani , Tietbohel and Moreira, 2011).

We can see through these studies that the cure rate and abandonment are outside the parameters recommended by the WHO, which states that the cure rate is around 85 % and the dropout to 5 % . This demonstrates the need for more effective measures, and consequently the increase in treatment rates observed.

As the existing literature, multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is one in which the bacterium is resistant to at least isoniazid and rifampicin, which creates obstacles to resolving actions of public health policies around the world (Casali et al., 2012 .) Multidrug resistance to drugs may be due to inadequate treatment, where dose, frequency or drug class are inadequate or lack of adherence to treatment (Vander Werf et al., 2012).

According to data from the MS, the years 2001-2010 were 3,768 cases of MDR-TB, while the findings of our research show a percentage of 0.06% of the overall event. In Brazil, in 2004, new cases of TB, MDR-TB was 0.1%, and 0.4% of recurrences were part of the same category (Silveira, Adorno and Fontana, 2007). This percentage obtained is lower than countries like Swaziland, where the rate of MDR-TB in new cases is 7.7%, and previously treated patients is 33.8% (Sanchez-Padilla et al., 2012).

The technology available today for TB control for diagnosis, treatment and prevention could not contain sufficiently this disease worldwide. In Brazil, has not yet reached all the goals set. The healing of 85% across the country has never been achieved mainly by abandoning treatment that remains for many years around 12%. This reflects that the health services are still insufficiently organized to ensure adherence to treatment. The involvement of all services, and health care professionals in the fight contra TB is critical in a country like Brazil, which still has a high incidence of the disease (Hijjar and Procopio, 2006).

Conclusion

We conclude that although the study of TB has presented numbers lower incidence and prevalence over the years, is still observed low cure rate and a significant dropout rate. It is thus necessary, as the incentive to prevent infection, and the realization of spreading information related to the importance of effective treatment, expanding, for example, the strategy of supervised treatment in order to minimize the dropout rate and elevate the cure rate.

Acknowledgment

We thank the Graduate Program in Bioscience and Biotechnology Applied to Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences of the Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Araraquara, São Paulo, Brazil, and the sector of Epidemiology of Municipal Health Secretary Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

References

Assis EAR, Firmino KF. Tuberculose: perfil epidemiológico do município de Timóteo – MG, durante o ano de 2007. *Farmácia & Ciência*, 2010; 1: 52-63.

Augusto CJ, Carvalho WS, Gonçalves AD, Ceccato MGB, Miranda SS. Características da tuberculose no estado de Minas Gerais entre 2002 e 2009. *J Bras Pneumol*, 2013; 39: 357-364.

Bierrenbach AL, Gomes ABF, Noronha EF, Souza MFM. Incidência de tuberculose e taxa de cura, Brasil, 2000 a 2004. *Rev Saúde Pública*, 2007; 41: 24-33.

Campani STA, Moreira JS, Tietbohel CN. Fatores preditores para o abandono do tratamento da tuberculose pulmonar preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil na cidade de Porto Alegre (RS). *J Bras Pneumol*, 2011; 37: 776-782.

Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Harris SR, et al. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. New York: *Genome Res*, 2012; 22: 735-745.

Conde MB, Melo FAF, Marques AMC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin PTR et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J Bras Pneumol*, 2009; 35: 1018-1048.

Farmer PE, Nizeye B, Stulac S, Keshavjee S. Structural violence and clinical medicine. *PLoS Med*, 2006; 3:449.

Hijjar MA, Procópio MJ. Tuberculose Epidemiologia e Controle no Brasil. *Rev Hupe Uerj*, 2006; 5: 15-23.

Hino P, Cunha TN, Villa TCS, Santos CB. Perfil dos casos novos de tuberculose notificados em Ribeirão Preto (SP) no período de 2000 a 2006. *Ciênc Saúde Coletiva*, 2011; 16: 1295-1301.

Jung RS, Jung BJR, Sorvillo FBA. Trends in Tuberculosis Mortality in the United States, 1990–2006: A Population-Based Case-Control Study. *Public Health Rep*, 2010; 125: 389–397.

Mascarenhas MDM, Araújo LM, Gomes KRO. Perfil epidemiológico da tuberculose entre casos notificados no município de Piripiri, estado do Piauí, Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*, 2005; 14: 7-14.

Medeiros CJ, Pretti CBO, Nicole AG. Características demográficas e clínicas dos casos de tuberculose notificados pelo núcleo de epidemiologia hospitalar no município de Vitória, estado do Espírito Santo, Brasil, 2009-2010. *Epidemiol Serv Saúde*, 2012; 21: 159-166.

Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2010 (a).

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Boletim Epidemiológico / Especial Tuberculose, 2012; 43: 1-12.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Tuberculose: todas as formas. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

Ministério da Saúde. Tratamento diretamente observado (TDO) da tuberculose na atenção básica: protocolo de enfermagem. Brasília: Ministério da Saúde; 2010 (b).

Muniz JN, Ruffino-Netto A, Villa TCS, Yamamura M, Arcencio R, Cardozo-Gonzales RI. Aspectos epidemiológicos da co-infecção tuberculose e vírus da imunodeficiência humana em Ribeirão Preto (SP), de 1998 a 2003. *J Bras Pneumol*, 2006; 32: 529-534.

Paixão LMM, Gontijo ED. Perfil de casos de tuberculose notificados e fatores associados ao abandono, Belo Horizonte, MG. *Rev Saúde Pública*, 2007; 41: 205-213.

Pandolfi JR, Malaspina AC, Santos ACB, Suffys, PN, Oelmann MAC, Valentini SR, LEITE CQF. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl*, 2007; 28: 251-257.

Paz LNF, Ohnishi MDO, Barbagelata CM, Bastos FA, Oliveira JAF, Parente IC. Efetividade do tratamento da tuberculose. *J Bras Pneumol*, 2012; 38: 503-510.

Piller RVB. Epidemiologia da tuberculose. *Pulmão*, 2012; 21: 4-9.

Sanchez-Padilla E, Dlamini T, Ascorra A, Rüsck-Gerdes S, Tefera ZD, Calain P, et al. High prevalence of multidrug-resistant tuberculosis, Swaziland, 2009–2010. *Emerg Infect Dis*, 2012; 8: 29-37.

Silveira MPT, Adorno RFR, Fontana T. Perfil dos pacientes com tuberculose e avaliação do programa nacional de controle da tuberculose em Bagé (RS). *J Bras de Pneumol*, 2007; 33: 199-205.

Van der Werf MJ, Langendam MW, Huitric E, Manissero D. Multidrug resistance after inappropriate tuberculosis treatment: a meta-analysis. *J Eur Respir*, 2012; 39: 1511-1519.

World Health Organization. Global tuberculosis Control: surveillance, planning, financing: WHO/report, 2006; 362.

World Health Organization. Global tuberculosis Control: WHO/report, 2011; 16: 1-246.

Graphics and tables

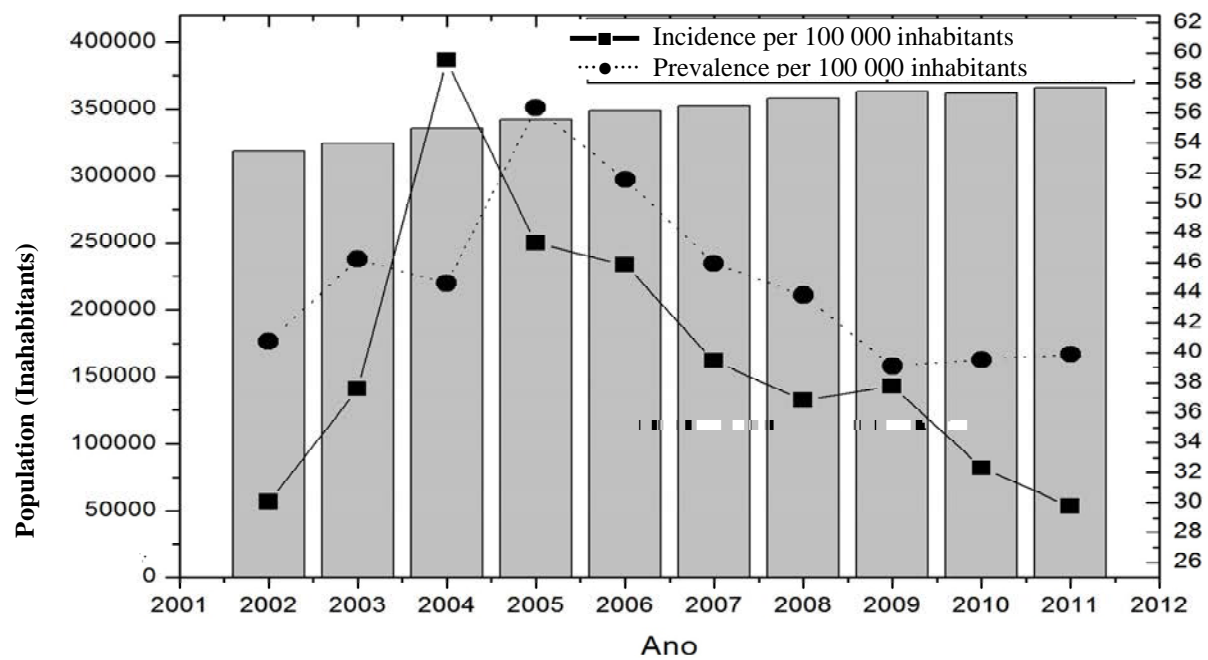


Figure 1: Incidence and prevalence of tuberculosis per year in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil, 2002-2011.
Source: IBGE / SINAN

Table 1. Epidemiological data classic sociodemographic patients with tuberculosis. Montes Claros, Minas Gerais, Brazil, 2002-2011.

Parameters	Sampling	%
Total notifications	1603	100
Gender		
Male	1003	62,57
Female	600	37,43
Age (years)		
<1 Ano	14	0,87
1 a 4	9	0,56
5 a 9	9	0,56
10 a 14	16	1,0
15 a 19	64	3,99
20 a 34	379	23,64
35 a 49	458	28,57
50 a 64	326	20,34
65 a 79	239	14,91
80 ou +	89	5,55
Ethnicity		
White	476	29,69
Black	186	11,6
Yellow	29	1,81
Mixed race	697	43,48
Indigenous	10	0,62
Ignored/white	205	12,79
Escolaridade		
Ignored/white	719	44,85
Analfabeto	110	6,68
Incomplete primary	499	31,13
Complet primary	50	3,12
Incomplete secondary education	74	4,62
Complete secondary education	76	4,74
Incomplete higher education	9	0,56
Complete higher education	40	2,5
Not applicable	26	1,62

Source: SINAN / Municipal Health Secretary of Montes Claros.

Table 2. Epidemiological data of patients with clinical tuberculosis. Montes Claros, Minas Gerais, Brazil, 2002-2011.

Parâmetros	Sampling	%
Chest X-ray		
Suspicious	1298	80,97
Normal	131	8,17
Other pathology	33	2,06
Unrealized	129	8,05
Ignored/white	12	0,75
Sputum bacilloscopy		
Positive	722	45,04
Negative	385	24,02
Unrealized	496	30,94
Form		
Pulmonary	1044	65,13
Extrapulmonary	478	29,82
Pulmonary + Extrapulmonary	81	5,05
Input type		
New case	1357	84,65
Recurrence	51	3,18
returns after default	81	5,05
Don't know	13	0,81
Transfer	101	6,3
Foreclosure situation		
Cured	850	53,03
abandonment	76	4,74
Death by tuberculosis	13	0,81
Death from other causes	48	2,99
Transfer	559	34,87
Change Diagnosis	26	1,62
Multidrug-resistant TB	1	0,06
Ignored/white	30	1,87

Source: SINAN / Municipal Health Secretary of Montes Claros.

Table 3. Comorbidities associated with patients with pulmonary tuberculosis. Montes Claros, Minas Gerais, Brazil, 2011-2012.

Comorbidities	Sampling	%
AIDS		
Yes	77	4,80
No	824	51,40
Ignored/white	702	43,79
Alcoholism		
Yes	135	8,42
No	1175	73,30
Ignored/white	293	18,28

Source: SINAN / Municipal Health Secretary of Montes Claros.